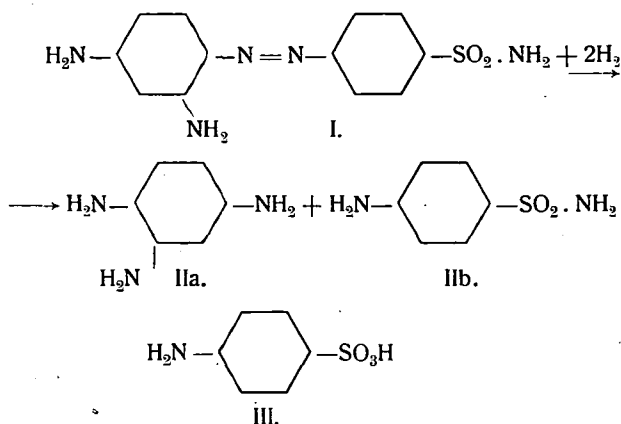


1:25000 enthält, tötete die hinzugefügten 15000 Streptokokken innerhalb 24 Stunden, während das Prontosil soluble selbst in einer Konzentration von 1:50 unwirksam blieb.

Das Gesagte kurz zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: Das von *Domagk* entdeckte Prontosil rubrum (I) wird im Organismus durch Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff in je 1 Molekül p-Aminobenzolsulfonamid (IIb) und 1,2,4-Triaminobenzol (IIa) gespalten. Die erste Verbindung ist in vivo und auch in vitro wirksam, die zweite unter beiden Umständen wirkungslos. Das unzersetzte Prontosil ist wirkungslos, nur im Organismus wird es in eine wirksame Verbindung verwandelt. Die p-Aminobenzolsulfosäure (Sulfanilsäure) (III) hat eine ähnliche aber schwächere Wirkung als die des p-Aminobenzolsulfonamids.



II. Kapitel.

Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate in Tierversuchen.

1. Allgemeine Gesichtspunkte.

Die Erörterung dieser von dem experimentellen Gesichtspunkt aus ausserordentlich wichtigen Frage erscheint uns als unerlässlich, und zwar nicht nur darum, weil es sich um die grundlegende Methodik der experimentellen Chemotherapie bakterieller Infektionen handelt, sondern auch deswegen da ohne Kenntnis dieser Frage die theoretische Behandlung des Wirkungsmechanismus nicht möglich bzw. verständlich ist. Wir sind uns darüber klar, dass das diesbezügliche Schrifttum zu umfangreich ist, um es in den Rahmen dieser Monographie in jeder Beziehung einbeziehen zu können, doch war dies keineswegs unsere Absicht. Wir möchten lediglich durch eine entsprechende Auswahl der Literaturangaben die Einsicht in gewisse Einzelheiten des Problems ermöglichen und auf Grund einiger Beispiele auch denen, die sich ohne entsprechende Erfahrungen mit der experimentellen Chemotherapie befassen wollen, einen Wegweiser

bieten. Wir glauben den zweiterwähnten Gesichtspunkt um so weniger vernachlässigen zu dürfen, als eine standard und allgemein anerkannte Wertbestimmungsmethode bisher nicht zur Verfügung steht, weshalb die Frage durch eine einfache Anweisung nicht erledigt werden kann.

Die chemotherapeutische Wirksamkeit der Sulfanilamidderivate wurde bisher gegen die verschiedensten menschen- und tierpathogenen Erreger erprobt. Die grösste Aufmerksamkeit aber wandte sich den Kokkeninfektionen zu. Die Zahl der mit anderen Krankheitserregern ausgeführten Untersuchungen ist verhältnismässig gering. Dementsprechend beziehen sich unsere Ausführungen beinahe ausschliesslich auf die Kokkeninfektionen, vor allem auf die Infektion mit Streptokokken und Pneumokokken.

Folgende Frage wird bei der experimentell-therapeutischen Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate gestellt: *Wie weit kann bei infizierten Tieren der Krankheitsverlauf mit den einzelnen Präparaten beeinflusst werden?* Das Verfahren steht, ähnlich allen biologischen Verfahren, auch unter dem Einfluss zahlreicher, vom Forscher unabhängiger Faktoren. Aus diesem Grunde kann auf die quantitativen Verhältnisse nur auf dem Wege über Vergleichen geschlossen werden. Bei diesen Vergleichen dient zumeist das Sulfanilamid als Standard.

Für die Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate kommen entsprechend dem Krankheitserreger und der zu lösenden Aufgabe verschiedene Versuchstiere in Betracht. In dieser Hinsicht hat man angefangen von den Affen die verschiedensten Tierarten verwandt, in der Praxis aber hat sich die Maus am besten bewährt. Gegen die Tierversuche wird oft eingewendet, dass ihre Verhältnisse von denen des menschlichen Organismus abweichen, weshalb die Versuchsergebnisse in der Klinik nur mit Vorbehalt ausgewertet werden könnten. Die Berechtigung dieser Einwendung wollen wir gerne anerkennen und wir glauben, dass es übertrieben wäre, die chemotherapeutische Wirksamkeit eines Mittels *allein* aus den Tierversuchen zu beurteilen. Andererseits steht es fest, dass der einzige Weg zur erfolgreichen Entwicklung der Chemotherapie über den Tierversuch führt.

Betrachtet man die experimentelle Infektion der Maus mit Strepto-, Staphylo-, Pneumo- und besonders Meningokokken, so fällt der von dem menschlichen abweichende Infektionsverlauf sofort auf: nach subkutaner oder intraperitonealer Einverleibung der entsprechend virulenten Strepto-, oder Pneumokokken kommt es zu einer allgemeinen Infektion und das Tier geht bald an einer Sepsis, meist in 24—48 Stunden — ein, ohne das geringste Zeichen einer natürlichen Immunität aufgewiesen zu haben. Dagegen verläuft die menschliche Infektion — mit seltenen Ausnahmen — in Begleitung zahlreicher defensiven Reaktionen. Die Maus ist also — im Gegensatz zum Menschen — vollkommen anergisch gegen diese Infektionen. Dieser Tatsache aber kommt vom Gesichtspunkt der Chemotherapie, wie es im folgenden gezeigt werden soll, eine nicht geringe Bedeutung zu, da an der Heilung sowohl die humoralen als auch die zellularen Faktoren des Organismus beteiligt sind. In die Rolle der humoralen Faktoren bieten folgende Versuche Einsicht.

Zunächst sollen die Untersuchungen *Loewenthals*²³⁰ besprochen

werden. Er behandelte die infizierten Mäuse kombiniert mit typspezifischem Streptokokkenserum und Sulfanilamid. Die getrennt unwirksamen Dosen beider Mittel waren bei der Kombination auffallend wirksam. Mit der kombinierten Therapie kann man zu einem Zeitpunkt — 18 Stunden nach der Infektion — wenn die obigen Mittel gesondert verabreicht selbst in den höchsten Dosen unwirksam bleiben, noch einen Erfolg erzielen. Ähnliche Beobachtungen machten *Branham* und *Rosenthal*,³³ die das Meningokokkenserum, ferner *MacLeod*,²⁵⁰ *Miller*,²⁷⁰ die das Pneumokokkenserum mit Sulfanilamid bzw. Sulfapyridin kombinierten. Über die günstigen Ergebnisse der kombinierten Vakzine-Sulfapyridinbehandlung bei Pneumokokkeninfektionen der Mäuse berichten *MacLean*, *Rogers* und *Fleming*,²⁴⁹ ferner *Schmith*.³²⁸ In dieser Hinsicht kommt den Versuchen von *Kaufmann* und *Schmith*¹⁸² mit den verschiedenen Salmonellen eine besondere Bedeutung zu. Obwohl die *S. enteritidis* und die *S. cholerae suis* im Reagenzglas gegenüber der Sulfanilamidderivaten sich sehr empfindlich verhielten und auch die *S. typhi murium* sich als mässig empfindlich erwies, konnte eine wesentliche therapeutische Wirkung nur gegen die *S. cholerae suis* erzielt werden. Hingegen war die kombinierte Behandlung mit Vakzine und Sulfapyridin erfolgreich, sogar auch gegen die *S. typhi murium*, die sich durch das Chemotherapeuticum allein kaum beeinflussen lässt. Im Laufe dieser Versuche wurden zwei Gruppen von je 20 Mäusen zweimal mit je 50—100 Millionen vorher auf 100° erhitzten *S. typhi murium* geimpft; nach einer Woche wurden die Tiere infiziert und zur Hälfte mit täglich 30 mg Sulfapyridin behandelt, die andere Hälfte diente als Kontrolle des Erfolges der Vakzinierung. Parallel hierzu wurden ähnliche Versuche mit unvorbehandelten Tieren angestellt. Von 20 mit Vakzine und Sulfapyridin behandelten Tieren blieben 14 am Leben, von 20 nur vakzinierten 3, von 20 nicht vakzinierten nur mit Sulfapyridin behandelten 4, von den überhaupt nicht behandelten Kontrollen nur 1. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten die mit *S. enteritidis* infizierten Tiere selbst unter ähnlichen Versuchsbedingungen nicht erhalten werden. Den Grund des Unterschiedes sehen die Forscher darin, dass auf die Vakzination mit dem typhimurium-Stamm die Mäuse mit der Erzeugung von Antikörper ansprechen, hingegen wird in dem mit *S. enteritidis* vorbehandelten Organismus, wahrscheinlich wegen der ungünstigen Antigenstruktur dieses Erregers, kein Antikörper erzeugt.

Die Annahme, dass bei der Sulfanilamidbehandlung zur Ergänzung der chemotherapeutischen Wirkung eine gesteigerte Ansprechbarkeit bzw. ein gewisser Immunitätszustand des Mäuseorganismus erforderlich ist, wird auch durch andere Tatsachen unterstützt. Zahlreiche Forscher haben beobachtet, dass von den mit Pneumokokken oder Streptokokken infizierten Mäusen die unbehandelten Tiere sehr rasch eingehen, während die mit mässigen Dosen des Chemotherapeuticums behandelten erst später einzugehen beginnen; die Mehrheit der Tiere erliegt am 5.—6. Tage nach der Infektion, später gehen sie immer seltener verloren und von den am 10.—14. Tage noch lebenden gehen nur wenige ein. *Hieraus ist klar ersichtlich, dass die Sulfanilamidwirkung* — wie es auch aus anderen Versuchen hervorgeht — *die Generalisierung der Infektion und hier-*

durch das Eingehen der Tiere verzögert bzw. den Infektionsverlauf derart verlangsamt, dass die Tiere in dieser Zeit endgültig genesen. Vom 7.—14. Tage an, wenn der Ausgang der Infektion so lange hinausgeschoben wird, ist schon eine bedeutende Immunität vorhanden; diesem Faktor dürfte aber vom Gesichtspunkt der endgültigen und restlosen Heilung aus Bedeutung zukommen. Dass *das Chemotherapeuticum die Entwicklung einer Immunität nicht hindert*, erhellt auch aus entsprechenden Versuchen. *Buttle*³⁹ fand bei den mit Pneumokokken infizierten und durch Behandlung mit 4,4'-Diaminodiphenylsulfon am Leben erhaltenen Mäusen einen beträchtlichen Immunitätsgrad vor. Über ähnliche Ergebnisse ihrer Mäuseversuche berichten auch *Whitby*,³⁷⁸ ferner *Schmidt* und *Hilles*.³²⁵ Letztere Verfasser machten auch in bezug auf den Zeitpunkt des Immunitätseintrittes und die Dauer der Immunität Erfahrungen. Sie verabreichten den Mäusen intraperitoneal 100 d. l. m. (10^{-7} ccm Fleischbrühekultur) vom Pneumococcus Typ 1 und behandelten die Tiere mit grossen Sulfapyridindosen. Wurden die am Leben gebliebenen Tiere nach 7—14 Tagen wieder infiziert, so blieben von ihnen 86% am Leben, hingegen nur 6%, wenn die Reinfektion nach 28 Tagen vorgenommen wurde. Sie sind der Ansicht, dass die mit Pneumococcus Typ 1 infizierten und mit Sulfapyridin behandelten Mäuse nur eine vorübergehende Immunität besässen, die aber zur Ergänzung der Chemotherapie für die endgültige Heilung einen wichtigen Faktor darstelle. Von den einschlägigen Beobachtungen seien noch die Ergebnisse von *Schmith*³²⁸ erwähnt. Sie führte bei den mit 10^{-4} ccm Bouillonkultur infizierten und durch energische Sulfapyridinbehandlung erhaltenen Mäusen am 8. Tage des Versuchs eine Reinfektion durch, indem die Tiere zum Teil mit dem homologen Typ, zum Teil mit lebenden zu 7 verschiedenen Typen gehörenden Pneumokokken behandelt wurden. Bei den mit dem homologen Typ infizierten konnte eine ansehnliche Immunität nachgewiesen werden, während von den mit heterologen Typen infizierten nur ein Bruchteil am Leben blieb. Sonach erwies sich die durch Vorbehandlung erworbene Immunität als typenspezifisch.

*MacLeod*²⁵⁰ misst der nach der Infektion entstehenden Immunität vom Gesichtspunkte der erfolgreichen Chemotherapie — Erhaltung des Lebens der Tiere — eine entscheidende Bedeutung bei. Hierdurch liesse sich die Tatsache erklären, dass gegen gewisse Pneumokokkentypen (z. B. Typ 3) die Sulfanilamide nur einen Partialschutz gewähren. Bekanntlich können die mit Typ 3 infizierten Mäuse — von wenigen Ausnahmen abgesehen — selbst mit der energischsten Sulfanilamidbehandlung nicht gerettet werden. Die Wirkung der Behandlung besteht lediglich darin, dass die behandelten Tiere die unbehandelten überleben und zumeist erst am 4.—6. Tage eingehen. Dagegen sind die mit Typ 1 infizierten Tiere mit der ausreichenden Dosis des entsprechenden Sulfanilamidderivates leicht zu retten. Er will diesen Unterschied dadurch erklären, dass er dem Typ 1 vorzügliche Antigeneigenschaften zuschreibt, während der Typ 3 bekanntlich ein schlechtes Antigen ist. *MacLeod* selbst sieht die schwache Antigenwirkung von Typ 3 auch durch seine eigene Versuchsergebnisse erwiesen; mit einer getöteten Vakzine (0,01 ccm Bouillonkultur) geimpfte Mäuse erlagen schon einer milden Infektion.

Beim ähnlichen Versuch mit Typ 1 ging fast kein einziges Tier ein. Die schwache Antigeneigenschaft des Typ 3 ist übrigens bekannt: durch diesen Stamm liess sich in Kaninchen der Kapselantikörper nur schwer herstellen. Zur Veranschaulichung dieser Verhältnisse sollen noch die Worte von B. White³⁷⁹ angeführt werden: „Thus, it is known to be more difficult to obtain a potent serum for Type III than for Type II Pneumococcus, and easier to produce serum of higher protective value for Typ I than for Type II“... „Attempts to produce serum effective against Type III pneumococci possessing as they do an unusually large amount of capsular material, have been disappointing.“

Obwohl laut obigem zwischen dem Antigenwert des Pneumococcus und seiner therapeutischen Beeinflussbarkeit ein Parallelismus angenommen werden kann, sind die Einzelheiten dieses Problems noch bei weitem nicht geklärt. Um über die allgemeine Gültigkeit dieses Zusammenhanges zu entscheiden, sind weitere Versuche anzustellen, die ausser auf die erwähnten Umstände auch auf die Sulfanilamidempfindlichkeit der verschiedenen Stämme Rücksicht nehmen.

Auf die Immunität, die sich bei mit Meningokokken infizierten und durch Sulfamethylthiazolbehandlung am Leben Gebliebenen Mäusen entwickelte, liessen meine folgenden Beobachtungen¹⁵⁸ schliessen: 22 Mäuse wurden mit 150 Millionen (1000 d. l. m.) Meningokokken Typ Gordon I, die einer Aszitesagarkultur entnommen in einem 5%-igen Magenmucin suspendiert waren, intraperitoneal infiziert und mit 5×10 mg Sulfamethylthiazol behandelt; trotz der Infektion konnten auf diese Weise alle Tiere gerettet werden. Am 12. Tage nach der Infektion erhielten die Mäuse 10 d. l. m. des in Mucin suspendierten homologen Stammes, zugleich wurden auch 10 Kontrolltiere infiziert. Die Kontrollen gingen innerhalb von 48 Stunden ausnahmslos an Meningokokkensepsis ein (die Kokken konnten aus dem Herzblut gezüchtet werden), dagegen wurden von den reinfizierten 22 Tieren nur 2 verloren. Hieraus folgt, dass in den mit Meningokokken infizierten und mit Sulfamethylthiazol behandelten Tieren sich eine ausgeprägte aktive (erworbene) Immunität entwickelt hat. Ich bin jedoch der Ansicht, dass die Mäuse diesen Faktor, d. i. die erworbene Immunität, für den restlosen Erfolg der Sulfanilamidbehandlung (für die Erhaltung ihres Lebens) bei der Meningokokkeninfektion nicht benötigen. Denn im Laufe dieser Meningokokkenversuche wurde beobachtet, dass die Lebensdauer der unbehandelten und der auf unzureichende Weise behandelten Tiere ungefähr die gleiche war. Die Kontrollen gingen innerhalb von 48 Stunden ein, die behandelten Tiere lebten aber kaum einige Stunden weiter, oder sie genasen. Solche Fälle, wie bei den Pneumokokkeninfektionen, wo die infizierten und behandelten Tiere manchmal nach einem 4-6-tägigen Wohlbefinden plötzlich eingingen, kamen hier nicht vor. Die mit Meningokokken (100—1000 d. l. m.) infizierten Mäuse schienen schon in den ersten Stunden nach der Infektion krank, und zwar nicht nur die Kontrollen, sondern auch die behandelten. Der Zustand der behandelten hat sich, sofern sie überhaupt genasen, rasch gebessert, die anderen gingen fast gleichzeitig mit den Kontrollen ein. Demnach kommt es bei der Sulfanilamid-

behandlung der mit Meningokokken infizierten Mäuse *in kurzer Zeit* entweder zu ihrer Heilung oder zu ihrem Tod, weshalb bei der Heilung die nur später eintretende, *erworbene* Immunität keine Rolle spielt. Aus dem Organismus des erfolgreich behandelten Tieres verschwinden die Krankheitserreger ausserordentlich schnell; so konnten die Meningokokken im Organismus der mit 1000 d. l. m. infizierten Mäuse nach 10 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden.

Die hier geschilderte Auffassung lässt sich mit der Ansicht *Prooms*,²⁹⁹ der auf Grund zahlreicher Versuche die Wirkungsunterschiede der Sulfanilamide bei der Meningo- bzw. Streptokokkeninfektion der Maus studierte, gut in Einklang bringen. Nach seiner Ansicht biete das Sulfanilamid gegen die Meningokokken einen viel stärkeren Schutz als gegen Streptokokken. Es sei gar nicht nötig, die Behandlung tagelang fortzusetzen, da der Meningococcus nicht imstande sei, sich in der Maus solche Lokalherde zu schaffen wie der Streptococcus. *Levaditi* und *Vaisman*²¹⁰ behaupten nämlich, dass die Streptokokken in der infizierten und mit Sulfanilamid behandelten Maus in der Milz der Tiere selbst am 8. Tage der Infektion noch nachgewiesen werden können und die von hier ausgehende Septikämie nur durch die Dauerbehandlung verhütet werden kann.

Auf Grund obiger Ausführungen ist also die Annahme zulässig, dass bei den Pneumococcus- und Salmonella-Infektionen zur Erzielung einer restlosen chemotherapeutischen Wirkung die von der erworbenen Immunität gebotene Unterstützung erforderlich ist, bei der intraperitonealen Meningokokkeninfektion der Maus aber diese Unterstützung entbehrt werden kann. Allerdings ist hier auch der Umstand zu berücksichtigen, dass die Maus gegenüber der Meningokokkeninfektion — im Gegensatz zu den Pneumokokken — wenig empfindlich ist, da sie über eine erhebliche angeborene Immunität verfügt, weshalb die Infektion mit einer geringen Anzahl von Keimen nur dann gelingt, wenn die natürliche Immunität des Tieres irgendwie, am besten mit Muzin, bekämpft wird. Der Mechanismus der Muzinwirkung ist vorläufig unbekannt, soviel steht aber fest, dass es sich um eine *örtliche und nur vorübergehende Wirkung* handelt. Mangels entsprechender Versuche ist es noch nicht geklärt, welche Bedeutung dieser natürlichen Immunität in dem Erfolg der Sulfanilamidbehandlung zukommt, wenn sie nach örtlichen und vorübergehenden Aufhören allmählich wiederkehrt.

Obwohl ausser den geschilderten auch andere Versuche dafür sprechen, dass es zur Ergänzung der Chemotherapie einer angeborenen oder erworbenen Immunität bedarf, möchten wir nicht verschweigen, dass in bezug auf die Streptokokkeninfektion der Maus diese Beweise vorläufig ausstehen. Ausser den schon zitierten Versuchen *Loewenthals*,²³⁰ die lediglich auf die Bedeutung der passiven Immunität hinweisen, fanden wir im Schrifttum keine einzige beweiskräftige Angabe, im Gegenteil, die Versuche sprechen gegen diese Theorie. Der Widerstand der mit Streptokokken infizierten und mit Prontosil geretteten Mäuse war in den Versuchen von *Levaditi* und *Vaisman*,²¹⁵ ferner *Nitti* und *Bovet*,²⁸⁶ gegen die Reinfektion keineswegs grösser als der normale. Wir möchten aber diesen negativen Versuchen vom Gesichtspunkte des Problems aus keine allzu grosse Bedeutung beimessen, zumal die Voraussetzungen der aktiven

Immunisierung der Mäuse gegen Streptokokken noch nicht genügend bekannt sind.

Obwohl in der Erforschung der chemotherapeutischen Wirksamkeit der Sulfanilamidderivate die Mäuseversuche überwiegen, müssen die Möglichkeiten der Verwendung anderer Tierarten auch kurz geschildert werden. *Domagk*³⁰ hält die lokale oder generalisierte Streptokokkeninfektion der Kaninchen für geeignet zur Wertmessung der chemotherapeutischen Wirksamkeit. Auch die intradurale Meningokokkeninfektion der Kaninchen eignet sich zu chemotherapeutischen Versuchen. Es kann Versuchsbedingungen geben, unter denen das Meerschweinchen der Maus vorzuziehen ist. Nach *Habs* und *Bader*,¹³⁹ ferner *Seaston*,³³⁵ sei die chronische Lymphadenitis der Meerschweinchen, bedingt durch hämolytische Streptokokken Gruppe C, zu chemotherapeutischen Studien gleichfalls geeignet. Bei der Erforschung der Chemotherapie von Gasödeminfektionen ist das Meerschweinchen nach *Schreus*³³³ und seinen Mitarbeitern, ferner *Ivánovics*, *Gieszer*, *Eöllös* und *Diczfalusy*,¹⁷² wegen seiner hochgradigen Empfindlichkeit und anderer Gründe das Versuchstier der Wahl.

Von den anderen in Betracht kommenden Versuchstieren empfehlen *Cooper* und *Gross*²⁷² zur chemotherapeutischen Erforschung der Pneumokokkeninfektionen weisse Ratten. Ihren Vorteil gegenüber der Maus sehen sie darin, dass bei diesem Tier der in Muzin suspendierte *Pneumococcus* Typ 3 bei intratrachealer Einführung nach den Beobachtungen von *Gunn* und *Nungester*,¹³⁸ ferner *Nungester* und *Jourdonais*,²⁹¹ regelmässig eine lobare Pneumonie hervorruft. Dieses Verfahren wird von *Gross* und *Cooper*^{130, 131} auch für die Versuche mit *Pneumococcus* Typ 1 und 2 vorgeschlagen. Diese Infektion eigne sich besonders darum zu chemotherapeutischen Versuchen, weil die Empfänglichkeit der Ratte und der Infektionsverlauf — entgegen der intraperitonealen Mäusesepsis — der menschlichen Krankheit mehr ähnlich sind. Bei den intratracheal infizierten Ratten soll 1. eine Lungenveränderung ähnlich wie beim Menschen auftreten, 2. die Infektion nicht so rapid verlaufen, wie bei den intraperitoneal infizierten Mäusen, so dass die Ratten im Gefolge der Infektion erst am 2.—6. Tage eingehen, 3. ein Teil der Tiere (cca 7—15%) auch spontan heilen.

Diese Umstände dürften mitverursacht haben, dass *Gross* und *Cooper* bei Ratten bessere Erfolge mit Sulfanilamid erzielten als bei Mäusen. Sie konnten die mit *Pneumococcus* Typ 3 intraperitoneal infizierten Mäuse mit Sulfanilamidbehandlung nicht retten, lediglich eine Verlängerung des Lebens wurde erzielt. Dagegen betrug die Letalität der mit dem selben Erreger intratracheal infizierten und sofort in Behandlung genommenen Ratten (14 Tage lang täglich 125 mg) nur 23% gegenüber 86% in der Kontrollgruppe. Die Verfasser betonen, dass diese Ergebnisse mit den am Krankenbett gemachten Erfahrungen erheblich besser übereinstimmen als die der Mäuseversuche.

2. Technik der Mäuseschutzversuche.

Hier sollen vor allem die technischen Gesichtspunkte berücksichtigt und die Besprechung der Literaturangaben möglichst vermieden werden. Wegen der Mannigfaltigkeit der Methoden wollen wir vor allem von unseren Erfahrungen ausgehen und die Technik beschreiben, die in den vergangenen Jahren unseren Versuchen zugrunde gelegt wurden. Hier und da können wir nicht umhin, auf Umstände hinzuweisen, die für das Problem wichtig erscheinen, obwohl wir darüber keine eigenen Erfahrungen haben. Im folgenden sollen die einzelnen technischen Fragen in Punkten kurz zusammengefasst besprochen werden.

a) Unterbringung und Fütterung der Versuchstiere.

Da die chemotherapeutischen Forschungen eine hohe Anzahl von Versuchstieren erfordern, sind nur Wenige in der glücklichen Lage, Mäuse von gleicher Züchtung und Abstammung verwenden zu können. Die von verschiedenen Stellen beschaffenen Tiere können nicht nur wegen der verschiedenen Herkunft, sondern auch wegen der verschiedenen Bedingungen ihrer Fortpflanzung und Aufzucht nicht als biologisch gleichwertig angesehen werden. Zweifels- ohne wird die Empfänglichkeit der Mäuse von den erwähnten Umständen beeinflusst, aber die Bedeutung dieser Unterschiede für die chemotherapeutischen Versuche ist nicht näher bekannt.

Bei uns werden die auf dem Markt gekauften Tiere zunächst in 40—50-er Gruppen 7—10 Tage beobachtet. Geht in dieser Zeit eine Anzahl der Tiere an einer, bei den Mäusen sehr häufigen Paratyphusinfektion ein, oder in einer Weise, dass der Grund des Eingehens nicht ermittelt werden kann, so werden die Tiere zu chemotherapeutischen Versuchen möglichst nicht verwendet. Während der Beobachtung und der Versuchsperiode erhalten die Mäuse folgende Kost: je 250 g feingemahlene Gerste und Mais, 3 g Kochsalz, 7 g Calcium carbonicum praecipitatum und 2 g trockene Bierhefe werden in 1 Liter heissem Wasser vermengt und unter stetem Rühren 20 Minuten gekocht. Nachher werden 50 g Casein und 20 g „Pekk“ (Chinoin, Ujpest) hinzugegeben und gut vermengt. (Pekk ist ein mit bestrahltem Ergosterin durchtränktes pflanzliches Vehikel). Von dieser Nahrung erhalten die Tiere täglich 10—15 g. Der Wassergehalt der Nahrung macht das Darreichen von Trinkwasser überflüssig.

3 Tage vor dem Versuch werden die in der herkömmlichen Weise markierten Tiere zu 5 bis 6 in einen mit Hobelspänen reichlich versehenen und mit Metallnetz bedeckbaren Glasbehälter von 185 mm innerem Durchmesser und 170 mm Höhe verlegt. Diese drei Tage sind nötig um zu beobachten, wie sich die Tiere aneinander gewöhnen. In den Versuchen werden mindestens 17 g wiegende Mäuse verwendet. Um trotz der Entwicklungsunterschiede möglichst einen guten Durchschnitt zu erhalten, werden die Tiere von verschiedenem Gewicht unter die Gruppen so weit als möglich gleichmässig verteilt. Während der Versuche wird die Streu 3-4-täglich gewechselt.

b) Die zu den Infektionen verwendeten Bakteriumstämme und ihre Virulenz:

Zur Aufbewahrung der Pneumo- und Streptokokkenstämme und Erhaltung ihrer Virulenz wird das sog. „Lyophyl“-Verfahren (Flosdorf und Mudd¹⁰³) angewandt. Die nach Erfrierung getrockneten Bakteriumsuspensionen bleiben in Vacuum sehr lange lebensfähig. Es genügt, Passage und Erfrischung in 6-12-monatigen Abständen vorzunehmen. Während der Versuchsperiode werden die Stämme nach 2—3 Mäusepassagen auf Blutagar gehalten und zur Erhaltung der Virulenz zweiwöchentlich auf eine Maus übertragen.

Nun hat sich die Frage erhoben, welche Stämme zur Wertbestimmung der Sulfanilamide verwendet werden sollen. Am besten entsprechen für Streptokokkenversuche die menschenpathogenen Pyogenesstämmen (nach *Lancefield: A*). Unter diesen befinden sich oft auch mäusepathogene Stämme. Gelegentlich reichen von diesen Stämmen einige Kokken aus, die Maus bei intraperitonealer Einführung zu töten, sofern sie sich durch einige Passagen an die Maus anpassen konnten. Zu Sulfanilamidversuchen wurde auch der Stamm „Richard“ vielerorts verwendet. Dieser Pyogenesstamm wurde im Laboratorium von Prof. *Colebrook* (London) ausgezüchtet. 10^{-9} ccm seiner jungen Bouillonkultur sind für die Maus sicher tödlich. Gegen die Bovinstämme (Gruppe B) kann die Maus auch geschützt werden. Es hat aber den Anschein, dass nicht alle Stämme gleichweise geeignet sind: *Long* und *Bliss*²³¹ erzielten bei der Infektion mit einem Stamm nur geringe Erfolge mit Sulfanilamid. Die zu verschiedenen akuten Tierinfektionen führenden C-Stämme lassen sich nicht nur bei Mäuse-, sondern auch bei Meerschweinchenversuchen verwenden (*Seastone*²³⁵).

Die Pneumokokkenstämmen Typ 1, 2 und 3 sind sofort nach ihrer Züchtung oder nach wenigen Passagen hochgradig mäusepathogen. Ihre Virulenz kann durch eine entsprechende Anzahl von Passagen maximal gesteigert werden, wobei unter maximaler oder voller Virulenz die tödliche Wirkung von einigen Kokken bei intraperitonealer Einverleibung zu verstehen ist. Da eine gut gedeihende Bouillonkultur von Pneumokokken mehr als 2 Milliarden Keime pro ccm enthält, kann die Wirkung von 10^{-8} – 10^{-9} ccm schon tödlich sein. Es gibt Typen, wo die Virulenz einiger Stämme selbst durch zahlreiche Passagen nicht auf das Maximum erhöht werden kann. So arbeiteten wir z. B. mit einem Stamm vom Typ 14, dessen kleinste tödliche Menge nach langdauernden Passagen nicht unter 10^{-2} – 10^{-3} ccm herabgesetzt werden konnte.

Erheblich schwerer sind die chemotherapeutischen Versuche mit Staphylokokken auszuführen. Aus den Literaturangaben geht hervor, dass die aus Menschen isolierbaren Stämme kaum mäusepathogen sind. Dagegen gelang die Isolierung einiger pathogenen Stämme aus Tieren. Vom Gesichtspunkte solcher chemotherapeutischen Versuche aus ist ein Bovinstamm von Dr. *G. A. H. Buttle* (Beckenham, Kent) besonders beachtenswert. Dieser erwies sich in Magenmazin suspendiert als besonders virulent.

In Zusammenhang mit der Virulenz der bei chemotherapeutischen Versuchen angewandten Stämme sei noch folgendes bemerkt: Unmittelbar nach der Entdeckung *Domagks* berichteten *Nitti* und *Bovet*²⁸⁵ über die Unwirksamkeit des Prontosil gegen sehr wenig virulente Streptokokkenstämmen. Diese auffallende Beobachtung wurde seitdem auch von anderen Verfassern bestätigt (*Colebrook* und *Kenny*,⁵⁸ *Long* und *Bliss*²³² und andere). Anscheinend ist aber dieses Verhalten nur für die wenig virulenten Stämme kennzeichnend, so fand z. B. *Rosenthal*³¹² zwischen den hoch- und mittelmässig virulenten Varianten desselben Pneumokokkenstammes keinen Unterschied in dieser Beziehung. Unlängst wurde diese Frage in Zusammenhang mit einem mässig (d. l. m. = $0,5 \times 10^{-3}$ ccm) und einem vollvirulenten Stamm („Richard“, d. l. m. = $0,5 \times 10^{-8}$ ccm) von *Fenyvessy*, *Kolozsi* und *Takátsy*⁹³ studiert. Im Reagenzglas verhielten sich alle drei Stämme gleich empfindlich gegen Sulfanilamid. Trotzdem waren die Heilergebnisse mit Sulfanilamid bei den mit mässig virulenten Stämmen infizierten Tieren besser als bei der Infektion mit dem vollvirulenten Stamm. (Die Infektion erfolgte in allen Fällen mit 100 d. l. m.). Die Verfasser sind der Ansicht, dass zur Wertbestimmung der Sulfanilamide unbedingt hochvirulente Stämme verwendet werden sollen.

Auch wir glauben, dass zur Messung der Sulfanilamidwirkung nur Stämme mit hoher Virulenz bzw. möglichst Vollvirulenz in Frage kommen, finden doch die natürlichen Infektionen auch zumeist mit solchen Stämmen statt. Im Falle von Strepto- und Pneumokokken-

versuchen bereitet diese Bedingung keine besondere Schwierigkeit. Dagegen müssen wir bei Meningo- und Staphylokokkenversuchen von diesen Bedingungen abgehen, da solche Stämme, von denen einige Kökken die Maus zu töten vermögen, nicht immer verwendet werden können.

c) Die Infizierung der Tiere.

Falls kein besonderer Umstand dagegen spricht, werden die Kokken der Maus intraperitoneal einverleibt. Zur Infektion verwendet man ganz junge in der Wachstumsphase befindliche Bouillonkulturen. Hierdurch kann die vollständige Vitalität und Virulenz der Keime am besten gesichert werden. Die technische Voraussetzung der Züchtung dieser empfindlichen Erreger ist eine besondere Sorgfalt bei der Herstellung der Fleischbrühe. Von diesem Gesichtspunkt aus verdienen die Arbeiten von Wright,³⁹⁶ ferner O'Meara und Macsween,³⁹² die dieses Problem systematisch studierten, einer besonderen Aufmerksamkeit. Auch bei uns wurde oft beobachtet, dass die zu Routinezwecken dienende Fleischbrühe sich zur optimalen Züchtung von Pneumokokken und Streptokokken nicht immer eignet. Aus diesem Grund stellen wir eine Herzbrühe her und zwar mit der Modifizierung der Vorschrift des Rockefeller-Institutes wie folgt:

Aus dem Schlachthaus werden möglichst viele Rinderherzen beschafft, von Fett und Bindegewebe sorgfältig gereinigt und fein gemahlen. 500 g Herzbrei werden mit 1 Liter Leitungswasser versetzt und über Nacht bei 4° C in einem Kühlschrank gehalten. Am nächsten Tag folgt Erwärmung auf 60° 30 Minuten lang, Filtrierung durch Flanell unter Auspressung des Restes. Jetzt werden 10 g Pepton Witte und 5 g Kochsalz hinzugefügt, über offener Flamme unter stetem Rühren bis zum Sieden gekocht, durch grobes Filterpapier filtriert, das pH mit n/1 Natronlauge auf 8,2 eingestellt, wieder 5 Min. gekocht und in heissem Zustand durch grobes Filterpapier wieder filtriert. Das Filtrat wird zu 5 ccm in Reagenzgläser oder zu 500 ccm in Kolben verteilt und bei 120° sterilisiert. Das endgültige pH dieser Fleischbrühe ist 7,8.

Herstellung der zur Infizierung verwendeten Kultur:

An dem Tage vor dem Versuch werden Mäuse mit je 0,5 ccm, der Fleischbrühenkultur des Stammes infiziert und nach 8—10 Stunden in moribundem Zustand mit Chloroform getötet. 1 Tropfen des Herzensblutes wird unter sterilen Kautelen auf Blutagar bzw. 5 ccm Bouillon geimpft. Die Bouillonkultur und das Blutagar werden am anderen Morgen gegen 9 Uhr in einem gefärbten Strichpräparat auf Reinigkeit geprüft. Ist die Bouillonkultur rein, so wird 1 ccm in 5 ccm Bouillon abgeimpft und bis 1 Uhr Nachmittag im Thermostat aufbewahrt. Zu dieser Zeit ist die Kultur schon vollentwickelt und zum Versuch geeignet. Nach wiederholter Prüfung auf Reinheit wird die Kultur mit Fleischbrühe verdünnt (*Salzwasser ist kein geeignetes Verdünnungsmittel!*). Zur Infizierung der Tiere entnimmt man 0,25—0,5 ccm der entsprechenden Verdünnung. Einige Tiere werden zur Kontrolle der Virulenz auch mit stark verdünnten Kulturen geimpft. Im Falle von vollvirulenten Strepto- und Pneumokokkenstämmen reicht die Impfung von je 3 Tieren mit den Verdünnungen 10^{-7} , 10^{-8} und 10^{-9} aus.

d) Behandlung der Tiere.

Bei der Wertbestimmung der antibakteriellen und besonders der antitoxischen Sera bereitet die Serumdosierung keine Schwierigkeiten. Gleichzeitig mit der Infektion werden verschiedene Serum-mengen einmal injiziert; dann kann die Serumdosis, die einen

hinreichenden Schutz bietet, einfach ermittelt werden. Bei chemotherapeutischen Versuchen ist die erste Schwierigkeit dadurch gegeben, dass die einmalige Behandlung zur Rettung der Tiere nicht genügt. Die Behandlung muss tagelang fortgesetzt bzw. wiederholt werden. Während dieser Zeit können einzelne Tiere eingehten, weshalb die spätere Behandlung — vom 4.—5. Tage an — nur bei einem Teil des Tierbestandes vorgenommen werden kann. Schon hieraus ist es klar zu sehen, welch grundlegenden Schwierigkeiten Rechnung zu tragen ist, wenn man die Wirkung verschiedener Chemotherapeutica vergleichen will. Die Schwierigkeiten treten noch mehr hervor, wenn auch die sonstigen Umstände wie z. B. Resorptions- und Ausscheidungsverhältnisse der einzelnen Mittel berücksichtigt werden. Obwohl die pharmakologischen Eigenschaften der Sulfanilamidderivate nicht in den Rahmen dieser Arbeit gehören, ist die Besprechung ihrer Resorption und Ausscheidung vom Gesichtspunkte der zu erörternden Probleme aus anscheinend unerlässlich.

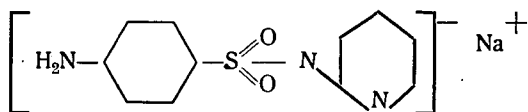
Die gegenüber einem idealen Chemotherapeuticum zu stellenden Forderungen lassen sich in einem Satz zusammenfassen: *mit der möglichst kleinsten Menge ist eine gleichmässige und anhaltende Konzentration im Organismus zu erzielen, die für die Wirkung ausreicht und von der toxischen Grenze fern liegt.* Da im Laufe der Wertbestimmungsversuche von der zweiten Bedingung abgesehen werden kann, gestaltet sich das Problem einfacher. Vom technischen Gesichtspunkt aus bedeutet es einen Vorteil, wenn zur Feststellung der Konzentration des Mittels im Organismus nur das Blut untersucht wird. Nach Vorausschickung obiger Ausführungen sollen nun die näheren Einzelheiten der Aufgabe betrachtet werden.

Zu Beginn der Prontosilperiode — nach Herstellung des Prontosil solubile — erschien zur Wertbestimmung die parenterale Anwendung als die einfachste. Bald wurde aber die perorale Verabreichung für besser gefunden, zumal das p-Aminobenzolsulfonamid und seine meisten Derivate sich im Wasser schwer lösen. Wegen ihrer schlechten Löslichkeit arbeiteten einige Forscher, z. B. *Rosenthal* und seine Mitarbeiter, mit öligen Suspensionen. Abgesehen von den technischen Schwierigkeiten dieser Methodik — zur Einverleibung der Ölsuspension ist eine dicke Nadel zu verwenden, dann fließt aber ein Teil der Flüssigkeit durch den weiten Stichkanal wieder heraus — ist gegen diese Methode manches einzuwenden. Nach den Beobachtungen von *Schmith*³²⁸ kann die Konzentration des Mittels im Organismus auf diese Weise kaum beeinflusst werden. In einem Versuch injizierte sie je Mäusen 0,25 bzw. 0,5 ccm einer öligen Sulfapyridinsuspension subkutan, d. h. 50 bzw. 100 mg Substanz. Von der 4. Stunde an bis zum 8. Tage verfolgte sie die Konzentration des Mittels in der Maus. Nach einer statistischen Verarbeitung ihrer Ergebnisse, die von uns vorgenommen wurde, betrug die durchschnittliche Blutkonzentration — auf Grund von je vier an den ersten drei Tagen durchgeführten Bestimmungen — und ihre Standarddeviation während dieser Periode für die mit 50 mg behandelten Tiere $15,2 \pm 2,7$ mg %, für die mit 100 mg behandelten $15,7 \pm 2,6$ mg %, also ebenso viel. Nach dem dritten Tag traten offensichtliche Unterschiede auf, indem die Blutkonzentration der mit der niedrigeren Dosis behandelten Tiere schnell abnahm, bei den mit 100 mg behan-

delten dagegen erheblich langsamer. Die Tatsache, dass der Blutspiegel bei der Verwendung der Ölsuspensionen von der Dosis wenig abhängt, erklärt *Schmith* dadurch, dass die Resorption eines Ödepots von dem im Öl enthaltenen Mittel unabhängig vor sich geht. Die intraperitoneale Einverleibung der Ölsuspensionen lässt aber die Mengenunterschiede zur Geltung kommen. *Marshall, Bratton, White und Litchfield*²⁶⁰ injizierten in die Bauchhöhle der Maus verschiedene Mengen aus einer Ölsuspension von Sulfanilylguanidin. Als die Tiere eingingen, wurden folgende Konzentrationen im Blut ermittelt: nach 0,5 g/kg $16,3 \pm 6,7$, nach 1 g/kg $68,0 \pm 24,2$, nach 2 g/kg $113,9 \pm 19$ mg %. Wir halten aber die intraperitoneale Einspritzung von Ölsuspensionen aus verschiedenen Gründen, auf die hier nicht eingegangen werden soll, für unzuweckmässig zur Behandlung der infizierten Tiere.

Zur parenteralen Behandlung mit den Sulfanilamidderivaten kommen auch ihre wasserlöslichen Natriumsalze in Betracht.

Das p-Aminobenzolsulfonamid und seine Derivate bilden — ausgenommen einige, z. B. das Sulfanilylguanidin — in Wasser ausgezeichnet lösliche Natriumsalze. Die einen Säurecharakter besitzenden Derivate, z. B. das Sulfapyridin, erfahren in wässrigen Lösungen folgende Dissoziation:



Das aus der schwachen Säure durch Neutralisierung mit Natronlauge gewonnene Salz dissoziiert schon ziemlich gut, erfährt deshalb eine Hydrolyse, in deren Folge seine Lösung stark alkalisch reagiert (pH: 10,8). Die Lösungen der Natriumsalze von Sulfapyridin und den ähnlichen Verbindungen — z. B. Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol — sind schon gegenüber dem Luftkohlendioxid sehr empfindlich, so dass auf seine Wirkung die freie Säure aus ihrer Lösung ausscheidet. Hierauf ist bei der Herstellung von Lösungen immer Rücksicht zu nehmen. Die Lösung eines Natriumsalzes wird am einfachsten in der Weise hergestellt, dass man m/1000 g Menge der Verbindung (z. B. aus Sulfapyridin 250 mg, aus Sulfamethylthiazol 260 mg) abwägt, mit 1 ccm von *karbonatfreiem* n/1 NaOH versetzt und mit *kohlensäurefreiem* Wasser dem Bedarf entsprechend verdünnt.

Die Natriumsalze der Sulfanilamidderivate werden nach parenteraler Anwendung sehr rasch resorbiert. Diese Methode ist aber zur Bestimmung ihrer chemotherapeutischen Werte wenig geeignet, da die Wirkung wegen der schnellen Ausscheidung nicht anhaltend ist. *van Dyke, Greep, Rake und MacKee*⁸³ injizierten 1 g/kg aus den Natriumsalzen des Sulfapyridin und Sulfathiazol der Maus subkutan und bestimmten die Konzentration der Mittel im Blute 1;3 und 6 Stunden nach der Injektion. Zu diesen Zeitpunkten fanden sie im Blut 74;69 bzw. 47 mg % Sulfapyridin und 90;69 bzw. 6 mg % Sulfathiazol. Demnach werden diese Mittel nach rascher Resorption und Erreichung von hohen Konzentrationen auch sehr schnell ausgeschieden.

Wenn nun die Kenntnisse von der parenteralen Anwendung zusammengefasst werden sollen, so ist festzustellen, dass diese Einverleibung für die Wertbestimmung aus mehreren Gründen unzuweckmässig ist. Noch weniger lassen sich z. B. die Versuche von *Rosenthal* und *Bauer*³¹⁴ auswerten, die in ihrer 1937 erschienenen Arbeit

die Wirkung des in Wasser gelösten Prontosil solubile mit der eines in Ölsuspension verabreichten Sulfanilamid verglichen.

Das Prontosil solubile wurde von *Domagk* und von den Nachprüfern des Mittels zumeist parenteral verabreicht. Später wurde immer mehr die perorale Darreichung bevorzugt, obwohl dies im Falle des Prontosil solubile überhaupt nicht notwendig war. Das Mittel wurde nämlich von *Rosenthal* und *Bauer*³¹⁴ peroral wirksamer gefunden als bei parenteraler Einfuhr. Noch mehr musste die orale Darreichung der Wertbestimmung dann zugrunde gelegt werden, als man mit der Prüfung der neueren in Wasser schwerlöslichen Derivate begann.

Die perorale Verabreichung ist bei der Maus ziemlich einfach. Eine auf Tuberkulinspritze angesetzte kurze, dicke, stumpf geschliffene Kanüle, oder eine mild gebogene Glasröhre von 1,5–2 mm Durchmesser, die mittels eines Gummischlauches an der Spritze befestigt wird, lassen sich in die Speiseröhre der Maus leicht einführen und gestatten die perorale Darreichung dieser Mittel in 0,1–1 ccm Volumen. Um die Suspensionen zu stabilisieren, nimmt man die Mittel in 1%-igem Tragacanthaschleim oder in einer 10%-igen Gummiarabicum-Lösung auf. Wichtig ist die feine Pulverisierung des Präparates, die am besten in einer Achat-Reibschale oder mit Hilfe einer Kugelmühle erfolgt. Die gleichmässig feine Pulverisierung des Stoffes ist nicht nur vom Gesichtspunkte der genauen Dosierung wichtig, sondern auch für die Ergebnisse, die von der Verteilung beeinflusst werden. *Mayer*²⁸⁷ erzielte mit der feinkörnigen Suspension bessere Erfolge als mit der grobkörnigen.

Das p-Aminobenzolsulfonamid und seine Derivate sind im allgemeinen schwerlöslich, ein Parallelismus aber zwischen dem Grad der Löslichkeit und der Geschwindigkeit der Resorption und Ausscheidung lässt sich für diese Verbindungen nicht nachweisen. Letztere Eigenschaften sind charakteristisch für die einzelnen Chemotherapeutica und in dieser Hinsicht weisen sie erhebliche Unterschiede auf. Tabelle 1., die mit der Berücksichtigung der Literaturangaben zusammengestellt wurde, gibt hierüber einige Aufschlüsse.

Zur Erklärung und Ergänzung der Tabelle sei folgendes angeführt:

Nach Einführung von 0,325 g/kg Suspension des in Wasser gut löslichen Sulfanilamid wird in 30 Min. eine beträchtliche Konzentration im Blute erreicht, die aber bald rapid abnimmt. Ähnliche verhält sich der Blutspiegel nach 0,25 g/kg. nach 0,5 g/kg beginnt die Abnahme erheblich später. Interessante Daten wurden über die Resorption des Sulfapyridins erhalten. Dieses schwerlösliche Präparat wird kaum langsamer resorbiert als das verhältnismässig gutlösliche Sulfanilamid. Beachtenswert ist in Zusammenhang mit dieser Verbindung, dass die Blutkonzentration in den ersten vier Stunden des Versuches von der Dosisgrösse auffallend wenig abhängt. Ein Unterschied zwischen den Tieren, die 0,25 g/kg und jenen, die 1–3 g/kg erhielten, liegt sicher schon zu dieser Zeit vor, dieser Unterschied aber ist bei weitem nicht so gross, als man auf Grund der Dosierungsunterschiede erwarten könnte. (S. die Tabelle.) Während die Dosis von 0,5 g/kg auf 3 g/kg also auf das sechsfache erhöht wird, steigt die Blutkonzentration in dem Frühstadium (2. Stunde) von 23 mg % nur auf 30–32 mg % an.

Die Ergebnisse von *Marshall*, *Bratton* und *Litchfield*²⁵⁹ sind mit dem Gesagten in Einklang und dienen sogar zur Ergänzung obiger Daten. Sie haben festgestellt, dass das peroral in Suspension eingeführte Sulfapyridin zum Anstieg der Blutkonzentration Anlass gibt, aber ohne einen linearen Parallelismus aufzuweisen, ferner, dass die Blutkonzentration über eine gewisse Grenze hinaus weiter nicht gesteigert werden kann. Die erreichbare höchste Konzentration wird mit 50 mg % angegeben, die bei der Fütterung von 6 g/kg und 16 g/kg gleich-

Tabelle 1.

Konzentration verschiedener Sulfanilamidderivate im Mäuseblut nach einmaliger Einverleibung der Suspensionen.

Auf Grund der Ergebnisse von verschiedenen Verfassern. Die Werte bedeuten mg % der freien Verbindung

Präparat	Dosis ^a g/kg	Konzentration ^b in den ersten Stunden nach der Einverleibung												Verfasser
		1/2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	24		
Sulfanilamid	0,325 ^f	26	23	19	15	10	21	4						Domagk ⁸⁰
"	0,25 ^d		17	13	5		3							Scudi und
"	0,5 ^d		30	22	20		13							Graessle ^{33d}
S. pyridin	0,25 ^e		11	23	23		18		16		11			Schmith ³²⁸
"	0,5 ^e		13	17	23		25		22		20			
"	1,0 ^e		24	28	28		31		29		25	3		
"	1,5 ^e		21	32	33		35		35		37	23		
"	2,0 ^e		27	32	33		30		32		36	15		
"	3,0 ^e		30	30	36		39		37		35			
" g	0,5 ^d	8	13	15		12		8						Marshall ²⁶⁰
" g	6,0 ^d	22	33	42		45		42						et al.
"	0,5		15	16		13				7		3		Long und
"	1,0		24			21				16		1		Feinstone ²³³
" g	0,5 ^d		21		18			13			8			van Dyke ⁸³
" g	1,0 ^d		24		18			21			14			et al.
" g	1,5 ^d		22		21			23			23			
S. thiazol ^g	0,5 ^d		12		10			1			1			"
" g	1,0 ^d		26		11			6			2			
" g	1,5 ^d		27		14			7			6			
S. methylthiazol	0,1 ^h			9		5		4				0		Barlow und
"	1,0 ^h			12		11		10				3		Homburger ⁷
"	0,5 ^d		8	11		11				9		4		Diczfa-
"	2,0 ^d		11	15		15				12		5		lusz ⁷¹
S. guanidin ^g	0,5 ^f	2	5	6		3		2						Marshall ²⁶⁰
" g	6,0 ^f	2	5	6		4		4						et al.

Bemerkungen:

- Wenn die Daten der Arbeit nicht in g/kg Körpergewicht angegeben wurden, beziehen sich die Werte auf 20 g Mäusegewicht.
- Werte zu ganzen Zahlen abgerundet.
- Durchschnittswerte von 3 Tieren.
- Durchschnittswerte von je 5 Tieren.
- bei je 1 Tier serienweise untersucht.
- Durchschnitt von 2 oder mehreren Tieren.
- Werte von dem in der Arbeit abgebildeten Graphikon mit annähernder Genauigkeit abgelesen.
- Durchschnittswerten von 50—70 Tieren.

Addendum:

Löslichkeit der einzelnen Präparate in mg %: nach Vonkennel³⁶⁸ im m/15 neutralen Phosphatpuffer bei 20° C, nach Marshall²⁶⁰ und seinen Mitarbeitern (im Klammern) im 37° warmen Wasser; Sulfanilamid 698 (1480), Sulfathiazol 72 (96), Sulfamethylthiazol 22, Sulfapyridin 71 (54), Sulfanilylguanidin (220).

weise erzielt wurde. In einigen Fällen beobachteten sie sogar eine höhere Blutkonzentration nach 6 g/kg als nach 16 g/kg. Dies bezieht sich aber nur auf die Frühperiode; später können schon der Dosis entsprechend erhebliche Unterschiede bestehen.

Über die Resorption des Sulfathiazol, das hinsichtlich Löslichkeit ungefähr dem Sulfapyridin entspricht, stellten van Dyke, Greep, Rake und MacKee⁸³ folgendes fest: Nach der einmaligen Einführung einer gleichen Dosis von Sulfapyridin und Sulfathiazol beobachtet man Unterschiede im Verhalten der Blutkonzentration. Nach Verabreichung von 0,5–1,5 g/kg wird die höchste Konzentration schon in der 2. Stunde erreicht, nach mittelgrossen Dosen erzielt das Sulfathiazol ein höheres Maximum als das Sulfapyridin. Der Sulfathiazolspiegel nimmt von der 3. Stunde an schnell ab und in der 6. Stunde sind die Werte schon sehr niedrig, das Sulfapyridin hingegen lässt sich selbst in der 9. Stunde noch in einer beträchtlichen Konzentration nachweisen. Somit wird das Sulfathiazol rasch resorbiert und ausgeschieden, während das Sulfapyridin eine träge Resorption aufweist, aber eine beständigere Konzentration gewährt.

Die merkwürdigsten Verhältnisse weist das Sulfanilylguanidin auf. Dieses in Wasser ziemlich gut lösliche Mittel erzielt im Blut selbst nach sehr hohen Dosen (6 g/kg) nur eine niedrige Konzentration, die durch die Höhe der Dosis kaum beeinflusst werden kann. Die Tabelle gibt überdies auch die Resorptionsverhältnisse des Sulfamethylthiazol an.

Zusammenfassend lässt sich nun folgendes feststellen: 1. *Das Ausmass der Resorption dieser Verbindungen steht nicht in geradem Verhältniss mit ihrer Wasserlöslichkeit.* 2. *Nach mittelhohen und hohen Dosen weist die Blutkonzentration in der Frühperiode kaum Unterschiede auf und die für eine Verbindung charakteristische höchste Konzentration kann selbst durch die äusserste Erhöhung der Dosis nicht überschritten werden.* 3. *Werden aus den Suspensionen einmalige niedrige oder mittelgrosse Dosen peroral verabreicht, so äussert sich der Unterschied nur in der Haltbarkeit der Blutkonzentration.*

In Kenntnis der obigen Daten soll nun ein Normalverfahren gesucht werden, das der Wertbestimmung der einzelnen Präparate zugrunde gelegt werden könnte. Zunächst soll festgesetzt werden, dass die für die Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate geeignete einheitliche Technik noch aussteht. *Bestimmt ist die entsprechendste und einfachste Darreichungsform die Suspension, obwohl, wie noch später darauf hingewiesen werden wird, selbst diese Methode zur Wertbestimmung nicht die zweckmässigste darstellt.* Sie hat einerseits den Nachteil, dass auf diese Weise eine gleichmässige Konzentration der Verbindungen im Blute nicht gesichert werden kann, andererseits die Blutkonzentration mit den verschiedenen Dosen nur bis zu einer gewissen Grenze gesteigert wird. Diese Umstände konnten die Forscher vor einigen Jahren noch nicht entsprechend berücksichtigen, oder, sofern sie hierauf Rücksicht nahmen, stand ihnen zur Ausschaltung der Fehlerquellen keine geeignete Methode zur Verfügung. Zur Zeit scheint es am Zweckmässigsten das Mittel zum Futter zu mischen. Mit dieser Frage wollen wir uns mit Rücksicht auf ihre Bedeutung in einem besonderen Kapitel befassen.

Hinsichtlich des Zeitpunktes, wo die Behandlung einsetzt, sowie der Zahl und Häufigkeit der Behandlungen, haben die Forscher äusserst verschiedene Wege eingeschlagen. Die meisten beginnen mit der Behandlung sofort nach der Infektion, dies bedeutet in der Praxis eine halbe Stunde Differenz. Zweifelsohne sind die Erfolge mit dieser Methode erheblich besser, als mit einer später einsetzenden Behand-

lung, obwohl auf die Strepto- und Pneumokokkeninfektion der Mäuse selbst eine nach Stunden beginnende Behandlung noch günstig wirkt. Im allgemeinen wird der Zeitpunkt, nach dem diese Behandlung kaum oder gar keine Aussicht mehr hat, mit der 6.—8. Stunde angegeben. Dies ist leicht zu verstehen, wenn man bedenkt, dass die meisten infizierten Mäuse schon 16—18 Stunden nach der Infektion eingehen oder sich im Sterben befinden. Der Umstand, dass in der Praxis die Chemotherapeutica erst nach dem Auftreten der Infektionsercheinungen verordnet werden, kann — wegen der kurzen Lebensdauer der Versuchstiere — nicht in Betracht gezogen werden, weshalb getrennte Versuche vom Gesichtspunkt der Verhütung bzw. der Heilung aus als sinnlos erscheinen.

Im Schrifttum werden zahlreiche Behandlungsmethoden angegeben. Hier sollen einige beispielsweise besprochen werden.

*Whitby*³⁷⁸ geht wie folgt vor: er gibt das Mittel sofort, dann in der 7. Stunde nach der Infektion, ferner am 1., 2., 3. und 4. postinfektiösen Tage, mithin sechsmal. Sein Schema oder ähnliche wurden zur Behandlung der Pneumokokkeninfektion der Mäuse auch von anderen Verfassern (z. B. *Ivanovics*,¹⁵⁷ *Gross*, *Cooper* und *Lewis*¹³²) gerne verwendet. Zur Erzielung einer gleichmässigen Blutkonzentration werden die Behandlungen zweckmässigerweise öfter als einmal täglich ausgeführt. *Schmidt* und *Hilles*³²⁴ empfehlen zur energischen Sulfapyridinbehandlung der mit den verschiedenen Pneumokokkentypen infizierten Mäuse 20 mg Dosen in Form der nachstehenden Kur: Kur A: in der 2., 8., 14. und 20. Stunde nach der Infizierung, dann 5 Tage hindurch 24stündlich, Kur B: 4 Tage lang 6stündlich, dann weitere 2 Tage 12stündlich, Kur C (sehr energisch): 7 Tage 6stündlich dann noch 3 Tage 12stündlich. In dieser Weise ist die gleichmässige Konzentration ungefähr gesichert, da es zur Erzielung einer beständigen und gleichmässigen Konzentration der Sulfanilamidderivate im Blute, nach *Marshall* und *Cutting*²⁶¹ im Falle peroraler Darreichung einer 4stündlichen Dosierung bedürftig ist. Die zu häufige Behandlung stösst aber auf technische Schwierigkeiten, ferner werden die Mäuse von der häufigen Sondierung stark mitgenommen, was für den Ausgang der Infektion kaum belanglos sein dürfte.

e) Beobachtung der Versuchstiere.

Für die Auswertung der Versuchsergebnisse sind sorgfältige Beobachtung, Feststellung des Zeitpunktes, in dem das Tier eingeht, ferner die Ermittlung der Todesursache sehr wichtige Faktoren. Zur Feststellung der durchschnittlichen Lebensdauer ist der Zeitpunkt des Eingehens so genau wie möglich zu beobachten. Die ständige Überwachung der Tiere über Tag und Nacht, um die Minute, in der das Tier eingeht, genau aufzeichnen zu können, lässt sich schwer durchführen, es ist dennoch erwünscht, dass in dieser Beziehung auch kleinere Unterschiede als 24 Stunden aufgezeichnet werden. Bei unseren Versuchen wurde die Lebensdauer der Tiere mit einer $\frac{1}{3}$ Tag-Genauigkeit festgestellt. Diese Aufgabe wurde wie folgt gelöst.

Die Tiere wurden um 2 Uhr nachmittag infiziert und anschliessend (innerhalb 30 Min.) zum ersten Male behandelt. Die nächste Behandlung folgte um 9 Uhr abends. Um 10 Uhr, am Ende der ersten 8-Stundenperiode, um 6 Uhr in der Früh und nachmittags um 2 Uhr, als die zweite bzw. dritte Periode endeten, wurde das Eingehen der Tiere verzeichnet, als ob der Tod der Tiere am Ende des betreffenden Tagdrittels eingetreten wäre. In der Wirklichkeit war die Lebensdauer der Tiere kürzer, als in den Aufzeichnungen, der Fehler lag aber immer

unter 8 Stunden. Während der Arbeitszeit wurden die Tiere häufiger beobachtet und die Leichen aus dem Käfig entfernt, um der Fäulnis und auch dem „Kannibalismus“ vorzubeugen.

Zur Feststellung der Todesursache wurden die eingegangenen Tiere seziert und ihre Organe, vor allem das Herzensblut, bakteriologisch verarbeitet.

Um die hiermit verbundene Arbeit zu vermindern, wurden gewisse Vereinfachungen durchgeführt, allerdings nur in den Fällen, wo die Tiere in der Vorperiode sich sicher als gesund erwiesen hatten. Vor allem haben wir die Kontrolltiere, sofern sie kurz nach der Infektion ungefähr gleichzeitig eingingen, nicht seziert. Bei den verspätet eingegangenen Tieren wurde die Sektion nie unterlassen. Bei den behandelten Tieren haben wir die Sektion und die bakteriologische Untersuchung in den Fällen, wo die Tiere die Kontrollen um einige Tage überlebten und ungefähr zur gleichen Zeit in einer grösseren Anzahl eingingen, nicht vorgenommen, bzw. nur jedes dritte, vierte Tier untersucht. Lebte das behandelte Tier bis zum 6.—7. Tage nach der Infizierung oder noch länger, wurde die Untersuchung nie unterlassen, desgleichen die Untersuchung der Tiere, die im Laufe der Behandlung verletzt wurden oder aus dem Arzneimittel etwas aspirierten. Die kurz nach den Kontrollen eingegangenen Tiere wurden ebenfalls untersucht.

Die Tiere, deren Tod auf eine andere Krankheit, z. B. Paratyphus zurückzuführen war oder bei denen die Todesursache nicht festgestellt werden konnte, wurden bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Nach unserer Ansicht werden die mit Strepto- oder Pneumokokken infizierten Tiere am zweckmässigsten 14 Tage lang beobachtet.

Für diese Versuchsdauer sprechen folgende Umstände: Nach 7 Tagen dürfen die Versuche nicht abgeschlossen werden, da Tiere auch nach dieser Frist eingingen. Dies erhellt aus einem unserer Versuche mit *Pneumococcus* Typ 1 (Tabelle 3, S. 31). Hier waren von 87 behandelten Tieren am 7. Tage noch 52 am Leben, am 14. Tage lebten nur noch 45. Ähnliche Erfahrungen machten wir auch im Laufe der Versuche mit anderen Pneumokokkentypen und hämolytischen Streptokokken (Gruppe A und B von Lancefield). Ferner konnten wir feststellen, dass dem Tod nach dem 14. Tag nur äusserst selten die experimentelle Infektion zugrunde liegt. Auch die Beobachtungen anderer Verfasser sprechen für eine 14tägige Versuchsperiode. *Long* und *Bliss*²³² fanden unter ihren mit Protosil und Sulfanilamid behandelten Mäusen keine einzige, die nach dem 14. Tage im Gefolge der Streptokokkeninfektion zugrunde gegangen wäre. *Litchfield*, *White* und *Marshall*²²² haben in einer ihrer Arbeiten die Häufigkeit des Eingehens von 1123 Mäusen, die mit verschiedenen Mitteln behandelt waren, graphisch dargestellt. An der Kurve kann abgelesen werden, dass die meisten Tiere vor dem 7. Tage eingingen, obwohl spärliche Todesfälle bis zum 14. Tage vorkamen. Von diesem Zeitpunkt an wurden kaum einige Tiere verloren. *Schmidt* und *Hilles*³²⁴ verloren von 308 mit verschiedenen Pneumokokkentypen infizierten und mit Sulfapyridin energisch behandelten Mäusen an den 1.—5. Tagen 13, an den 6.—10. Tagen 72, an den 11.—15. Tagen 34. Zwischen dem 16. und 30. Beobachtungstag wurde kein Tier mehr verloren, Ähnliche Ergebnisse verzeichneten an *Raiziss*^{304, 305} und seine Mitarbeiter.

Eine über 14 Tage dauernde Versuchsperiode ist aus mehreren Gründen nicht günstig. Abgesehen davon, dass die Tiere auch weiter beobachtet und gepflegt werden müssen, kann der Umstand, dass in dieser Periode Tiere an interkurrenten Krankheiten eingingen, sehr störend wirken. Mit der Ausschliessung dieser Tiere nimmt der Versuchstierbestand ab. Eine längere Beobachtungszeit ist auch aus dem Grunde nicht erwünscht, weil die später zu besprechende „14tägige maximale Lebensdauer“ vom Gesichtspunkt der Auswertung der Ergebnisse den wahren Verhältnisse am nächsten steht.

3. Methoden zur Vergleichung der Wirkung der Präparate und Auswertung der Ergebnisse.

Der Inhalt dieses Punktes lässt sich am besten auf Grund einiger Versuche besprechen. Diese Methode erleichtert die Veranschaulichung der praktischen Gesichtspunkte und bietet zugleich eine Übersicht aller Probleme, die bei der Beurteilung der Wirkung von Sulfanilamidderivaten zu berücksichtigen sind. Die im folgenden beschriebenen Versuche werden zum Teil aus unseren bereits erschienenen Arbeiten zitiert, die meisten aber werden an dieser Stelle zum ersten Male veröffentlicht.

a) Orientierende Versuche.

Ist nur die Frage zu beantworten, welche von mehreren Präparaten wirksamer, weniger wirksam oder wirkungslos sind, so behandelt man am einfachsten identisch infizierte Mäuse mit der gleichen gegebenen Menge der fraglichen Verbindungen. Zu diesen Versuchen ist die Dosis der Sulfanilamidderivate so zu wählen, dass die Verbindung, die der Vergleichung als Grundlage dient, — zumeist das Sulfanilamid — den Tieren nur einen mittelmässigen Schutz gewähren soll, da auf diese Weise auch die Wirkung der stärker oder schwächer wirkenden Präparate zur Geltung kommen kann. Hinsichtlich der Dosis kann höchstens eine Orientierung gegeben werden, da ihre Grösse von der Art des Erregers, der Empfindlichkeit des Stammes, der Schwere der Infektion, dem Zeitpunkt des Behandlungsanfanges usw. gleichweise abhängt. Obwohl der Einfluss dieser Umstände nur auf Grund von Vorversuchen erwogen werden kann, möchten wir einige Daten, denen zum Teil unsere zum Teil in der Literatur erschienene Erfahrungen zugrunde liegen, hier mitteilen.

Im Institut haben *Diczfalusy* und *Eöhlös*⁷² 19 Mäuse mit 500—1000 d. l. m. des hämolytischen Streptokokkenstammes „Richard“ intraperitoneal infiziert und 4 Tage mit zweimal subkutan verabreichten 2,5 mg Sulfanilamid behandelt. Von den Tieren lebten am Ende des Versuches noch 16. Diese Dosierung und Behandlung ist zweckmässig, wenn es sich um die Erprobung eines voraussichtlich schwächeren Präparates als das Sulfanilamid handelt. Erwartet man aber eine stärkere Wirkung, so ist diese Dosis unzureichend, die Behandlung ist mit niedrigeren Dosen (cca 1,5 mg) durchzuführen. In den *Pneumococcus*-Versuchen hat sich die perorale Darreichung von Suspensionen bewährt, die meist nach dem Schema von *Whitby* ausgeführt wurde. Für Versuche mit *Pneumococcus* 1 oder 7 gibt man nach dem obigen Behandlungsschema Dosen zu 10 mg. Massive Infektionen mit diesen Typen oder mildere mit den Typen 2,3 und 5 erfordern Dosen von 20—25 mg. Unter den Meningokokkenstämmen befinden sich zahlreiche, die gegenüber den Sulfanilamidderivaten empfindlich sind. Darum genügen oft bei Versuchen mit diesem Erreger ganz niedrige Dosen (2—3 mg).

Zur Veranschaulichung der orientierenden Versuche eignet sich sehr gut der nachstehende Versuch,¹⁵⁸ der von mir mit dem *Meningococcus* Typ *Gordon I* vorgenommen wurde.

Die d. l. m. des wiederholt passierten Stammes betrug in Muzin 150.000—200.000 Kokken. Aus seiner Agarkultur wurde eine 5%-ige Muzinsuspension hergestellt und am 5. 12. 1939 Mäusen intraperitoneal einverleibt (0,5 ccm). 1/2, 3, 6 und 20 Stunden nach der Infektion erhielten die Tiere je 1 mg subkutan von den Natriumsalzen der in Tab. 2. verzeichneten Präparate.

Tabelle 2.

Schutzwirkung verschiedener Sulfanilamid-Natriumsalze bei intraperitoneal mit Meningokokken infizierten Mäusen.

Präparat	Einverleibung (s. c.)	Zahl der Tiere	am Leben geblieben	
			Zahl	%
(Kontrolle)	—	12	0	0
Sulfanilamid	4 × 1 mg	22	7	32
Sulfapyridin	"	24	10	42
Sulfamethylthiazol	"	28	20	72

Wie ersichtlich, konnten mit dem als Grundlage der Vergleichung dienenden Sulfanilamid 32 %, mit Sulfapyridin 42 %, mit Sulfamethylthiazol 72 % der Tiere gerettet werden.

Es fragt sich nun, ob der beobachtete Unterschied — mit Rücksicht auf die geringe Zahl der Tiere — für diese Präparate typisch oder lediglich durch den Zufall bedingt ist. Zu diesem Zweck wurden die gewonnenen Daten der *Pearson*-schen χ^2 -Probe unterzogen (die ausführliche Anwendung der Formel ist auch im Werk von *Pearl*²⁹⁶ zu finden). Hieraus hat sich für den Unterschied zwischen der Sulfanilamid- und der Sulfapyridin-Gruppe ein χ^2 -Wert von 0,52 ergeben. Dies bedeutet, dass die beobachtete Verteilung von zwei in vollkommen identischer Weise wiederholten Versuchen einmal allein durch den Zufall bedingt sein kann. Demnach kann der Unterschied nicht verwertet werden. Der Unterschied zwischen der Sulfanilamid- und der Sulfamethylthiazol-Gruppe ist aber zweifellos signifikant: $\chi^2 = 10,2$. Diese Zahl bedeutet nicht weniger, als dass der Versuch mehrere Hundert Male wiederholt werden müsste, um die beobachtete Verteilung allein als Folge des Zufalles beobachten zu können. Bei den Meningokokkenversuchen darf die Lebensdauer der Tiere im Sinne des Kap. II, Pt. 1. ausser acht gelassen werden, da die Lebensdauer der Kontrolltiere und der trotz der Behandlung eingegangenen voneinander kaum abweichen.

In bezug auf die Wirksamkeit der untersuchten Sulfanilamidderivate lässt sich auf Grund des obigen Versuches folgendes feststellen: mit der subkutanen Verabfolgung der Natriumsalze konnte die schnelle, gleiche und restlose Resorption der Präparate gesichert werden, es steht also fest, dass die verabreichte Menge ihre Wirkung entfalten konnte. Da die Injektionen in der kritischen, unmittelbar auf die Infektion folgenden Periode in verhältnismässig kurzen Abständen wiederholt wurden, war die Konzentration der Präparate im Blut — wenigstens während dieser Periode — beinahe gleich und beständig. Obwohl die Ausscheidung der Mittel rasch erfolgt sein dürfte, war ein wesentlicher Konzentrationsunterschied im Gefolge der häufigen Behandlungen zwischen den einzelnen Präparaten kaum vorhanden. Zwar war die Wirkung des Sulfanilamid und des Sulfapyridin in diesem Versuch ungefähr gleich, doch ist das zweite Mittel mit Rücksicht auf sein anderthalbfach grösseres Molekulargewicht als anderthalbfach wirksamer anzusehen, da die Zahl seiner eine identische Wirkung ausübenden Moleküle selbstredend niedriger war. Dasselbe gilt auch vom Sulfamethylthiazol, dessen Molekulargewicht noch grösser als das des Sulfapyridin ist; überdies war diese Verbindung im Versuch erheblich wirksamer als das Sulfapyridin, weshalb anzunehmen wäre, dass die Wirksamkeit seines Moleküls die des Sulfanilamidmoleküls mehrfach übertrifft.

Im folgenden mit *Pneumococcus* Typ 1 vorgenommenen Versuch war der chemotherapeutische Wert der einzelnen Präparate wegen mehrerer Umstände schwerer zu beurteilen als im obigen Beispiel.

Mit der Bouillonkultur des vollvirulenten *Pneumococcus* No. 103 vom Typ 1 ($0,25 \times 10^{-6}$ ccm = cca 1.000 d. l. m.) wurden aus 10–12 Tieren bestehende Gruppen infiziert und die einzelnen Gruppen nach dem Schema von *Whitby* insgesamt 6-mal mit je 10 mg des in 1%-igem Tragacanthaschleim suspendierten Präparates (Sulfanilamid, Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol, Sulfapyridin) peroral behandelt. Die Versuche wurden zweimal, am 28.6 und am 14. 7. 1939 unter völlig identischen Umständen wiederholt ausgeführt. Die einzeln beobachteten Ergebnisse der zwei Untersuchungen samt ihren Gesamtergebnissen wurden in Tabelle 3. aufgestellt. Über den zeitlichen Verlauf des Eingehens der bei den zwei Versuchen angewendeten Tiere gibt Tabelle 4. Aufschluss.

Tabelle 3.

Mäuseschutzversuch mit Pneumococcus Typ 1.

Infektion: 1000 d. l. m.

Präparat	Versuchsbeginn	Zahl der Tiere			Durchschnittliche Lebensdauer der verendeten Tiere	Lebensdauer		Prigge-Index
		am Anfang	am 7. Tage	am 14. Tage		max. 7	max. 14	
Kontrolle	28.6.1939	6	0	0	1,66	1,66	1,66	60,2
	4.7.1939	8	0	0	1,28	1,28	1,28	83,2
	Durchschnittswerte	14	0	0	1,47	1,47	1,47	73,6
Sulfanilamid	28.6.1939	10	3	2	3,37	4,10	5,50	26,8
	4.7.1939	11	4	3	4,25	5,00	6,33	18,9
	Durchschnittswerte	21	7	5	3,81	4,56	6,00	22,6
Sulfathiazol	28.6.1939	10	7	5	5,66	6,13	9,86	9,9
	4.7.1939	12	7	7	3,73	5,63	9,77	11,1
	Durchschnittswerte	22	14	12	4,70	5,85	9,79	10,6
Sulfamethylthiazol	28.6.1939	10	8	7	5,66	6,76	10,50	5,7
	4.7.1939	12	8	7	4,53	5,65	10,51	9,6
	Durchschnittswerte	22	16	14	4,95	6,16	10,50	7,8
Sulfapyridin	29.6.1939	10	7	7	5,11	6,43	11,3	6,2
	4.7.1939	12	8	7	6,00	6,41	10,66	7,8
	Durchschnittswerte	22	15	14	5,65	6,42	10,97	7,1

Aus Tab. 3. lässt sich feststellen, dass sich die Ergebnisse der zwei Versuche nicht wesentlich von einander unterscheiden. Die geringe Abweichung in der Zahl der eingegangenen Tiere und ihrer Lebensdauer dürfte durch Zufall bedingt sein. Solche geringe Unterschiede sind um so weniger zu beachten, als ähnliche mit einer derart

Tabelle 4.

*Chronologische Reihenfolge des Eingehens der mit Pneumococcus
Typ 1 infizierten und behandelten Tiere.*

Präparat	Zahl der Tiere	Tag des Eingehens									am Leben geblieben an 14. sten Tag	
		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	Zahl	%o
Kontrolle	14	2	12								0	0
Sulfanilamid	21		1	5	6	1	1	2			5	23,8
Sulfathiazol	22			1	6	1		1		1	12	54,5
Sulfäthylthiazol	22				4	1		3			14	63,6
Sulfapyridin	22				2	3		2		1	14	63,6

geringen Zahl von Tieren durchgeführten Versuche auch bedeutendere Unterschiede aufweisen können.

Aus den Daten von Tabelle 4. lässt sich der Gang des Versuches rekonstruieren. Die Wirkung der einzelnen Präparate kommt in der Lebensdauer der Tiere und in der Zahl der erhaltenen zum Ausdruck. Bei der Auswertung der Ergebnisse sind beide Umstände zu berücksichtigen.

Wird das Leben der Tiere durch die Behandlung nur verlängert, aber nicht gerettet, so schliesst man auf die Wirksamkeit aus der durchschnittlichen Lebensdauer. Unter Beachtung der statistischen Gesichtspunkte kann diese Methode zur Beurteilung der chemotherapeutischen Wirksamkeit geeignet sein. Bleibt aber ein beträchtlicher Teil der Tiere infolge der Behandlung am Leben, so kommt der durchschnittlichen Lebensdauer der eingegangenen vom Gesichtspunkte der Auswertung keine grosse Bedeutung zu, denn es kann vorkommen, dass die durchschnittliche Lebensdauer einer energisch behandelten und trotzdem eingegangenen Gruppe kürzer ist als die der anderen, weniger energisch behandelten. Zur Erklärung dieses scheinbaren Widerspruches ist zunächst auf die Empfindlichkeitsunterschiede der Tiere hinzuweisen, weshalb sie auf dieselbe chemotherapeutische Wirkung nicht in gleicher Weise ansprechen. Das Leben der Widerstandsfähigsten rettet man evtl. mit einem milden chemotherapeutischen Eingriff, während die mässig oder sehr wenig widerstandsfähigen trotz der Behandlung verloren gehen. Demnach ist das Schicksal der in die zweite und in die dritte Gruppe gehörenden Individuen identisch, hinsichtlich der Lebensdauer weisen sie aber Unterschiede auf: die mässig widerstandsfähigen leben länger als die widerstandsfähigen, weshalb der Durchschnitt sich als günstiger erweisen kann, als in den Fällen, wo die energische Behandlung auch die mässig widerstandsfähigen Individuen rettet. Hieraus folgt, dass der Hundertsatz der durch die Behandlung geretteten Tiere und die durchschnittliche Lebensdauer der eingegangenen nicht immer in einem engen Parallelismus stehen. Um den Wert der Behandlung aus diesen zwei Daten richtig beurteilen zu können, müssen diese zwei verschiedene Faktoren irgendwie „auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden.“ Betrachtet man diese Aufgabe mit dem Auge des Mathematikers, so kann man sich die Lebensdauer des geretteten Tieres im Verhältnis zur Lebensdauer des eingegangenen als unendlich denken. Wird aber die Lebensdauer des geretteten Tieres als unendlich lang betrachtet, so kann kein arithmetischer Mittelwert errechnet werden. Um diese Schwierigkeit auszuschalten, bezeichnet man — auf Grund von empirischen Daten, entsprechend dem Charakter der einzelnen Infektionen — den nächsten Termin als Grenze, nach dessen Ablauf infolge der Infektion kein

Tier mehr eingeht. Die Feststellung dieses Termins kann aber nur mit einem gewissen Fehler stattfinden. Im Zusammenhang mit der Beobachtungsdauer wurde erwähnt, dass die überwiegende Mehrheit der behandelten Tiere spätestens in der zweiten Woche eingeht und nach diesem Termin Todesfälle nur ausnahmsweise vorkommen. Wird nun die Beobachtungsgrenze noch mehr, z. B. bis zum 28. Tag hinausgeschoben, so kann die wirkliche Lebensdauer auch der Tiere beobachtet werden, die als seltene Ausnahmen gelten. Dieses Hinausschieben der Versuchsfrist würde zur Folge haben, dass die Lebensdauer der geretteten Tiere mit einem längeren Zeitraum figurieren wird, als die Frist, vor deren Ablauf das Eingehen der Tiere — abgesehen von den wenigen Ausnahmen — beendet ist. Da dieser Zeitpunkt praktisch am Ende der zweiten Woche eintritt, haben wir die Lebensdauer der geretteten als Maximum mit 14 Tagen gerechnet — unbekümmert um die Ausnahmefälle — und den Durchschnitt auf dieser Grundlage ermittelt. Bei der Errechnung des Durchschnittes werden also zu der Summe der Lebensdauer eingegangenen Tiere je 14 Tage pro gerettetes Tier hinzugegeben, und der erhaltene Betrag wird durch die Zahl der am Versuch beteiligten Tiere dividiert. Die so errechnete Zahl wurde von uns „Lebensdauer max. 14“ genannt. Selbstverständlich ist dieser Wert nur ein Index, der sich für arithmetische Berechnungen nicht eignet. Wir glauben aber, dass diese mit dem 14tägigen Termin errechnete Lebensdauer die wahren Verhältnisse getreuer darstellt als die von *Whitby*³⁷⁸ verwendete ähnliche Ziffer, die auf einer 7tägigen Beobachtung fusst. Dieser Termin ist nach unserer Ansicht zu kurz gemessen; in der zweiten Woche fallen noch zahlreiche Tiere der Infektion zum Opfer, weshalb ein auf dieser Grunlage errechneter Index die Verhältnisse nicht wahrheitsgemäss darstellt.

Der von *Prigge*²⁹⁸ vorgeschlagene Index, die Absterbegeschwindigkeit, gestattet das Ausserachtlassen der sich auf die Lebensdauer beziehenden empirischen Daten. Der Index wurde vom Verfasser zur Auswertung der chemotherapeutischen Versuche bei Tuberkulose eingeführt und von seinen Mitarbeitern⁴ auch bei den Pneumokokkenversuchen herangezogen. Der Begriff „Absterbegeschwindigkeit“ ergibt sich aus dem hundertfachen reziproken Wert der in Tagen ausgedrückten Überlebensdauer:

$$A = \frac{100}{U}$$

Lebt das Tier nach der Infektion nur 1 Tag, so ist $A = 100$, Lebt es $\frac{1}{2}$ Tag, so ist $A = 200$, bei einer Überlebensdauer von 50 Tagen ist $A = 2$ usw. Für die geretteten Tiere ist $A = 0$, weil die Lebensdauer theoretisch als unendlich betrachtet werden kann. Selbstverständlich kann auch dieser Index zu arithmetischen Zwecken nicht verwendet werden.

Jetzt wollen wir auf die Frage zurückkommen, welche Rückschlüsse der besprochene Versuch in bezug auf den chemotherapeutischen Wert der einzelnen Präparate gestattet. Am Ende des Versuches (am 14. Tage) lebten von den mit Sulfanilamid behandelten Tieren nur 5, während in den Gruppen der mit den drei anderen Präparaten behandelten Tiere von je 22 in der einen Gruppe 12, in den zwei anderen je 14 Tiere gerettet werden konnten. Der Wirkungsunterschied zwischen Sulfanilamid und den anderen Präparaten scheint schon auf Grund dieser Zahlen auffallend. Dass der beobachtete Unterschied nicht auf Zufall zurückzuführen ist, erhellt aus der χ^2 -Probe. Der Wert von χ^2 beträgt, auf Grund des Unterschiedes der Sulfanilamid- und der Sulfamethylthiazolgruppe errechnet, 6,9. Dies bedeutet, dass der Unterschied unter 100 Experimenten nur einmal zufallsbedingt sein dürfte. So lässt sich die Rolle des Zufalles mit grosser Wahrscheinlichkeit ausschliessen. Die drei anderen Mittel weisen Unterschiede auf, deren Bedeutung nicht besonders gross ist: der Unterschied zwischen Sulfathiazol bzw. Sulfamethylthiazol und Sulfapyridin ergibt einen χ^2 -Wert von 0,272, weshalb die beobachtete Verteilung als identisch anzusehen ist.

Die Wirksamkeitsunterschiede gehen aus den Indexen „Lebensdauer max. 7“, „Lebensdauer max 14“ und dem *Priggeschen* Index gleicherweise hervor. Auch hier erscheint ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Sulfanilamid und den drei anderen Präparaten, während letztere nur unwesentlich von einander abweichen. Da diese Zahlen zu entsprechenden statistischen Berechnungen nicht herangezogen werden können, *lässt es sich nur auf Grund unseres Eindrucks feststellen, dass die Wirkung des Sulfapyridin und Sulfamethylthiazol ungefähr gleich ist, während das Sulfathiazol etwas schwächer wirkt als die zwei anderen.* Somit weisen, obwohl zwischen den drei Mitteln ein statistisch nachweisbarer Unterschied auf Grund der Zahl der überlebenden Tiere nicht beobachtet werden konnte, die ermittelten Indexzahlen doch darauf hin, dass sich das Sulfathiazol unter den gegebenen Versuchsbedingungen als ein schwächeres Chemotherapeuticum erwies, als das gleichwirksame Sulfapyridin und Sulfamethylthiazol.

Unsere Beobachtungen lassen sich mit den ähnlichen mit *Pneumococcus* Typ 1 angestellten Versuchen anderer Verfasser gut in Einklang bringen. *Barlow* und *Homburger*⁷ behandelten mit 100 d. l. m. intraperitoneal infizierte Mäuse peroral mit den Suspensionen von Sulfapyridin und verschiedenen Thiazolderivaten des Sulfanilamid. Sie haben auf Grund der Ergebnisse, die bei aus 40–50 Mäusen bestehenden Gruppen gewonnen wurden, festgestellt, dass die gleichen Dosen von Sulfapyridin und Sulfamethylthiazol den Tieren ungefähr den gleichen Schutz gewähren. Dagegen war das Sulfathiazol, obwohl seine Dosis um 25% höher war, etwas schwächer als die zwei anderen Mittel. Dass das in Suspension peroral eingeführte Sulfathiazol gegen die *Pneumokokken* Typ 1 etwas schwächer als das Sulfapyridin wirkt, geht auch aus den Versuchen von *MacKee*²⁴⁷ und seinen Mitarbeitern klar hervor.

b) *Bestimmung der Wirksamkeit der Präparate durch vergleichende Titrierung.*

Auf Grund obiger Versuche erhält man nur auf die Frage Antwort, in welcher Reihe die geprüften Mittel hinsichtlich Wirksamkeit nacheinander folgen. Aus der Anwendung einer gewissen Dosis kann nicht auf die quantitativen Verhältnisse gefolgert werden. Um auch diese kennen zu lernen, bedarf es der Vergleichung der Wirkung von verschiedenen Dosen. Für die Versuche, die auch die quantitativen Verhältnisse berücksichtigen, sind nachstehende Beispiele aufschlussreich.

Am 15., 17. Mai und 24. Juni 1939 wurden Gruppen von 6–12 Mäusen mit der Bouillonkultur des *Pneumococcus* No. 103 vom Typ 1 infiziert und mit verschiedenen Dosen von Sulfanilamid und Sulfathiazol behandelt. Die Präparate wurden in *Tragacanthaschleim* suspendiert peroral, nach dem *Whitbyschen* Schema eingeführt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 5. ersichtlich.

Auf Abb. 1. werden die in der Tabelle aufgestellten Ergebnisse graphisch dargestellt.

Auf Grund der Tabelle und der graphischen Abbildung lässt sich über den Wert der zwei Präparate folgendes sagen:

Der verwendete Stamm war vollvirulent, indem 75% der Tiere, die mit $0,5 \times 10^{-9}$ ccm seiner Bouillonkultur geimpft wurden, eingingen. Bei der Keimzählung wurden in obiger Bouillonmenge 1–3 Kokken gefunden. Demnach wäre eine stärkere Verdünnung kaum imstande gewesen, die Tiere regelmässig zu töten.

Tabelle 5.

Vergleichende Titrierung des Sulfathiazol und Sulfanilamid bei den mit Pneumococcus Typ 1 intraperitoneal infizierten Mäusen.

(Summierung der am 15. 5. 1939, 17. 5. 1939 und 24. 6. 1939 ausgeführten Versuche.)

Die Infektion (ccm Bouillon- kultur)	Die Behandlung	Zahl der Tiere	am Leben geblieben		Durchschnittliche Lebensdauer der verendeten Tiere	Lebensdauer max. 14,	Prigge-Index
			Zahl	%			
$0,5 \times 10^{-9}$	(Kontrolle)	8	2	25	1,6	4,7	50,0
$0,5 \times 10^{-8}$	"	16	2	13	1,6	3,1	57,0
$0,5 \times 10^{-7}$	"	16	0	0	1,3	1,3	79,0
$0,5 \times 10^{-6}$	"	14	0	0	1,4	1,4	73,6
$0,5 \times 10^{-4}$	"	40	0	0	1,1	1,1	90,1
$0,5 \times 10^{-4}$	Sulfanilamid 6×5 mg	16	0	0	3,9	3,9	28,0
"	" 6×10 mg	24	2	8	4,5	5,3	22,1
"	" 6×20 mg	40	7	18	6,3	7,6	14,3
"	S. thiazol 6×5 mg	16	0	0	4,1	4,1	31,0
"	" 6×10 mg	39	5	13	4,3	5,6	24,2
"	" 6×20 mg	35	22	63	5,9	11,0	6,3
"	" 6×30 mg	30	24	80	6,3	12,5	3,2
"	" 6×40 mg	14	12	86	7,8	13,2	1,9

Diese Menge ist also die kleinste tödliche Dosis. Die zur Vergleichung der chemotherapeutischen Mittel dienenden Mäuse erhielten 100.000 d. i. m. Wie ersichtlich, haben sich die mit 5 und 10 mg Sulfanilamid bzw. Sulfathiazol behandelten Tiere ungefähr *gleichweise* verhalten. Wird auch der weitere Verlauf der Wirksamkeitskurven berücksichtigt, so hat man den Eindruck (s. Abb.), dass das Sulfathiazol selbst bei der Anwendung der Dosen von 5 und 10 mg etwas günstiger abschneidet. Dies lässt sich aber nur auf Grund der Lebensdauerkurven oder der Überlebenskurven feststellen, während der *Priggesche* Index gerade das Gegenteil zu beweisen scheint: bei der Verabreichung von geringen Dosen soll das Sulfanilamid besser wirken. (Der *Priggesche* Index ist eine Zahl, deren Grösse sich umgekehrt wie die Wirksamkeit verhält). Diese paradoxe Erscheinung, ferner andere hier nicht zu erörternde Gründe, schliesslich theoretische Erwägungen haben uns überzeugt, dass sich der *Priggesche* Index zur Auswertung der Pneumokokkenversuche weniger eignet als die mit einem 14tägigen Maximalwert errechnete Lebensdauer.

Der Unterschied zwischen der Sulfanilamid- und Sulfathiazolwirkung beginnt von der 20 mg Dosis aufwärts offensichtlich zu werden. Leider können vom Sulfanilamid höchstens 30 mg verabreicht werden, da schon diese Dosis stark toxisch wirkt. Die die Sulfathiazolwirkung darstellende Lebensdauerkurve hat einen merkwürdigen Verlauf: zwischen 10 und 20 mg wird sie plötzlich steil, dann weist sie einen der echten Parabel entsprechenden Verlauf auf. Diese Aenderung lässt sich an der die Sulfanilamidwirkung darstellenden Lebensdauerkurve nicht beobachten, es fragt sich aber, ob diese Wendung bei höheren Dosen nicht eingetreten wäre. Vom Sulfanilamid steht fest, dass selbst seine höchste tolerierte Dosis nur eine unbedeutende chemotherapeutische Wirkung besitzt. Die Lebensdauer der Tiere war im Falle der Pneumokokkeninfektion Typ 1 verlängert, aber nur wenig Tiere konnten mit dem Mittel gerettet werden.

Das Sulfanilamid war gegen Pneumokokken auch in den Versuchen von *Buttle*⁴¹ und Mitarbeitern, *Rosenthal*,³¹² *Cooper*, *Gross* und *Mellon*,⁶⁰, ⁶³ *Whitby*,³⁷⁸

Long und Mitarbeitern²³⁵ ferner in unseren eigenen¹⁵⁷ nur wenig wirksam. Die Pneumokokkeninfektion der Mäuse wurde lediglich so weit beeinflusst, dass die Tiere etwas länger lebten als die Kontrollen; höchstens ein kleiner Bruchteil von ihnen bleibt am Leben. Sonach stimmen die Ergebnisse unserer Versuche mit den Literaturangaben gut überein.

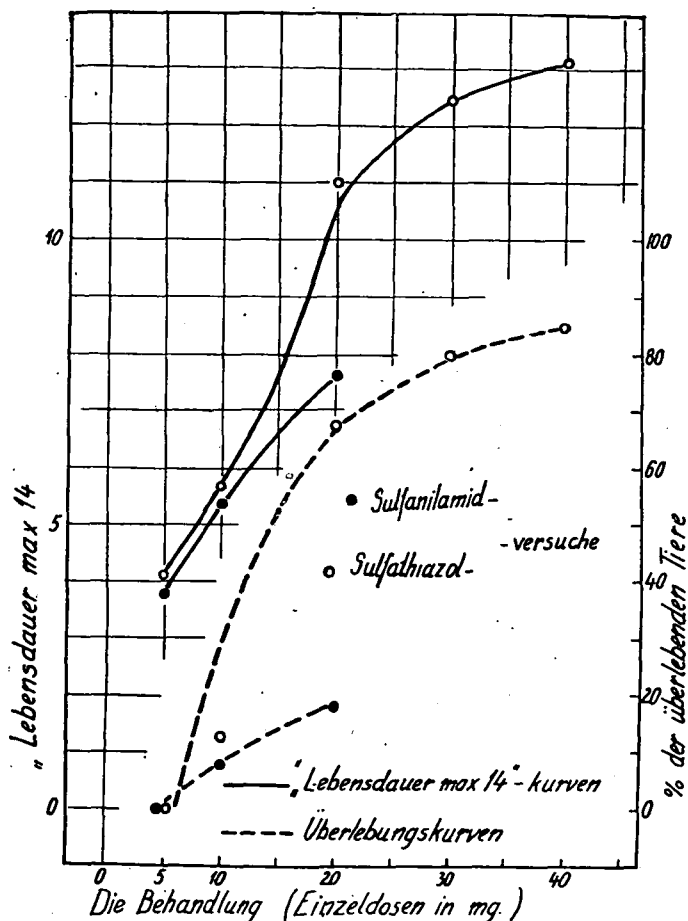


Abb. 1.

Hundertsätze der mit 100.000 d.l. m. des Pneumococcus Typ 1 infizierten und mit Hilfe des Sulfanilamid oder Sulfathiazol am Leben erhaltenen Tiere und die Werte der „Lebensdauer max 14.“

Der eigenartige Verlauf der mit Sulfathiazol erzielten Lebensdauerkurve lässt den Gedanken auftauchen, dass die chemotherapeutische Wirkung des Mittels im Falle von niedrigen Dosen auf einem anderen Wege zur Geltung kommt als bei Dosen über 20 mg. Wir glauben, dass es sich um einen scheinbaren Unterschied handelt, der dadurch bedingt sein dürfte, dass die Verbindung *entsprechend ihren Einzeldosen* eine auch verhältnismässig verschieden hohe und anhaltende Blutkonzentration zustande bringt. Wie aus Tabelle 1. ersichtlich, ist der Sulfathiazolgehalt des Blutes nach der Dosis 0,5 g/kg (10 mg pro Maus) ziemlich niedrig (höchstens 12 mg %), auch diese nimmt schnell ab. Die Dosis von 1 g/kg (20 mg pro Maus),

bei deren Verabreichung die chemotherapeutische Wirkung des Präparates sprunghaft ansteigt, gibt zu einer beträchtlich höheren Blutkonzentration Anlass als es auf Grund der 0,5 g/kg Dosis erwartet werden könnte. Diese Dosis führt zu einem Blutspiegel von 26 mg %, überdies sinkt dieser Spiegel erheblich langsamer als nach 10 mg. Die Dosis von 1,5 g/kg = 30 mg beeinflusst die maximale Konzentration im Blute kaum mehr, die erreichte Konzentration hält aber länger an als nach niedrigeren Dosen. Stellt man nun die chemotherapeutische Wirkung der Sulfathiazoldosen den Angaben über die Resorption des Mittels gegenüber, so fällt die Tatsache auf, dass *bei der Steigerung der Dosis von 10 auf 20 mg sowohl die Konzentration des Präparates im Blute als auch die Stärke seiner chemotherapeutischen Wirkung sprunghaft erhöht werden.* Jenseits von dieser kritischen Aenderung des Kurvenverlaufes hat die weitere Erhöhung der Dosis nur eine allmähliche Steigerung der Blutkonzentration und des Schutzes zur Folge. Dieser Parallelismus ist ein gutes Beispiel für die enge Beziehung, die zwischen der Wirkung der Chemotherapeutica und ihrer Resorption bzw. Ausscheidung besteht. Hier sei wieder einmal darauf hingewiesen, dass den eigentümlichen Resorptions- und Konzentrationsverhältnissen, die für jedes Präparat mehr oder weniger kennzeichnend sind, vom Gesichtspunkte der chemotherapeutischen Wirksamkeit aus eine sehr grosse Bedeutung zukommt. Aus Tab. 1. ersieht man, dass mit der Erhöhung der Sulfanilamiddosen die Höhe seiner Blutkonzentration und die Dauer der gesteigerten Konzentration gleichmässig ansteigen. Die Wirksamkeit des Präparates steigt ebenso gleichmässig an (Abb. 1.). Ferner ersieht man, dass, obschon 0,5 g/kg (10 mg pro Maus) eine höhere und anhaltendere Konzentration zur Folge hat als die doppelte Sulfathiazolmenge, letzteres Mittel doch energischer wirkt als die gleiche Menge Sulfanilamid.

Will man nun die Frage beantworten, wie vielmal wirksamer das Sulfathiazol als das Sulfanilamid ist, so ist folgendes zu berücksichtigen: Von dem Sulfanilamid konnten wegen seiner Toxizität Dosen über 20 mg nicht verabfolgt werden. Dieser Umstand bedeutet eine besondere Schwierigkeit für die Antwort, da zur Vergleichung aus den erörterten Gründen nur 20 mg oder höhere Dosen von Sulfathiazol in Betracht kommen. Wenn man jetzt von der Lebensdauerkurve abliest, wie viel mg Sulfathiazol erforderlich sind, eine gleiche Wirkung wie 20 mg Sulfanilamid zu erzielen, lässt sich feststellen, dass diese Dosis ungefähr 14–14,5 mg. beträgt. Das Mittel erscheint als etwas stärker wirksam, wenn der Berechnung die Kurven der geretteten Tiere zugrunde gelegt werden: in diesem Fall würden 20 mg Sulfanilamid ungefähr 10 mg Sulfathiazol entsprechen. Angenommen, dass die den fehlenden Sulfanilamidversuchen entsprechende Kurve ähnlich wie die bereits vorhandene Strecke verläuft, wird zur Erzielung der gleichen Wirkung durchschnittlich die zweifache Menge Sulfanilamid wie die Sulfathiazoldosis erfordert. Nimmt man auch noch auf das Verhältnis der Molekulargewichte der zwei Präparate Rücksicht (250:170), so ergibt sich, dass sich das Sulfathiazol im Versuch als dreimal stärker als das Sulfanilamid erwies.

Die geschilderten Verhältnisse beziehen sich nur auf den Fall, wenn die Infizierung, wie im obigen Versuch, mit 100.000 tödlichen

Dosen erfolgt. Bei leichteren Infektionen verschieben sich die Verhältnisse zugunsten des wirksameren Mittels. Vergleicht man diesen Versuch mit einem in Tab. 3. enthaltenen, bei dem die Infektion mit 1000 d. l. m. desselben Pneumococcus Typ 1 vorgenommen wurde, wird sofort klar, dass diese mildere Infektion von 10 mg Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol oder Sulfapyridin erheblich besser beeinflusst wird. Die Tatsache, dass dieselbe Behandlung bei einer milden Infektion wirksamer ist als bei einer schweren, erscheint als selbstverständlich und es ist sogar erstaunlich, dass es sich nicht immer so verhält. So lässt sich dies z. B. in den mit Pneumococcus Typ 2 ausgeführten in Tab. 6. zusammengefassten Versuchen nicht nachweisen.

Tabelle 6.

Vergleichende Titrierung des Sulfanilamid, Sulfathiazol und Sulfapyridin den mit Pneumococcus Typ 2 intraperitoneal infizierten Mäusen.

(Summierung der am 3. 3. 1939 und 8. 5. 1939 ausgeführten Versuche.)

Die Infektion (ccm Bouillon- kultur)	Die Behandlung		Zahl der Tiere	am Leber geblieben		Durchschnittliche Lebensdauer der verendeten Tiere (in Tagen)	Lebensdauer max 14 ⁴
				Zahl	%		
$0,3 \times 10^{-9}$	(Kontrolle)		8	6	75	1,5	—
$0,3 \times 10^{-8}$	"		10	0	0	1,4	1,4
$0,3 \times 10^{-7}$	"		15	0	0	1,6	1,6
$0,3 \times 10^{-6}$	"		8	0	0	1,1	1,1
$0,3 \times 10^{-4}$	"		31	0	0	1,1	1,1
$0,3 \times 10^{-4}$	S. amid	6×5 mg	17	0	0	3,2	3,2
"	"	6×10 mg	16	0	0	3,9	3,9
"	"	6×20 mg	15	0	0	5,3	5,3
"	S. thiazol	6×5 mg	17	0	0	3,2	3,2
"	"	6×10 mg	16	0	0	5,4	5,4
"	"	6×20 mg	14	1	7	6,0	6,6
"	"	6×31 mg	12	3	25	6,0	8,0
"	"	6×50 mg	8	2	25	6,5	8,4
"	S. pyridin	6×5 mg	8	0	0	4,3	4,3
"	"	6×10 mg	12	0	0	3,3	3,3
"	"	6×20 mg	8	2	25	6,6	8,5
$0,3 \times 10^{-6}$	S. amid	6×5 mg	12	0	0	3,0	3,0
"	"	6×10 mg	12	0	0	3,3	3,3
"	"	6×20 mg	12	0	0	5,8	5,8
"	S. thiazol	6×5 mg	12	1	8	3,0	3,8
"	"	6×10 mg	12	0	0	5,1	5,1
"	"	6×20 mg	12	2	17	5,5	7,1

Wie ersichtlich, konnte nach der Infektion mit diesem Typ nur ein geringer Bruchteil der Tiere gerettet werden. Ferner lässt es sich auf Grund der Lebensdauerkurven feststellen, dass der gewährte Schutz schwächer ist als bei *Pneumococcus* Typ 1. Infolge des milderen Anstieges der Lebensdauerkurven kann am Abschnitt zwischen den Dosen von 10 und 20 mg die sprunghafte Änderung des Schutzes nicht beobachtet werden (Abb. 2).

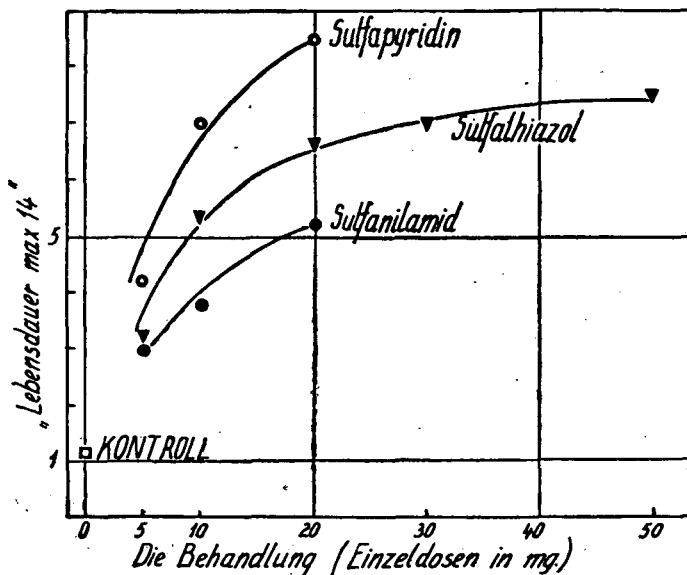


Abb. 2.

Werte von „Lebensdauer max 14“ der Tiergruppe die mit 10.000 d. l. m. *Pneumococcus* Typ 2 infiziert und mit verschiedenen Präparaten behandelt wurden.

Die Kurven der Abb. 2. lassen in bezug auf die Wirkung der einzelnen Mittel folgende Verhältnisse erkennen: bezeichnet man die Sulfapyridinwirkung mit 1, so beträgt die Wirkung des Sulfathiazol 0,6, die des Sulfanilamid 0,33.

Auch die Infektion mit Pneumokokken Typ 3 ist schwer zu beeinflussen. Von den in Tabelle 7. befindlichen 86 Tieren konnte nur eine einzige Maus gerettet werden. Die Wirkung der Präparate äußert sich allein in der Verlängerung der Lebensdauer.

Auf die Unterschiede, die in Zusammenhang mit den verschiedenen Pneumokokkentypen beobachtet werden können, möchten wir unter Berufung auf einige Literaturangaben noch im folgenden hinweisen. Nach Schmidt und Hilles^{32a} könne ein wesentlicher Anteil der mit Pneumokokken Typ 1 und 7 infizierten Tiere mit Sulfapyridinbehandlung am Leben erhalten werden. Am schwächsten sei die Infektion mit den Typen 2, 3 und 8 zu beeinflussen, während auf die Typen 4, 5, 6, 9, 22, 29, usw. eine mässige Wirkung zur Geltung komme. Infektionen mit Typ 1 oder 7 lassen sich auch von Sulfamethylthiazol gut beeinflussen (Ivanovics¹⁵⁷), die mit Typ 2 und 3 erheblich weniger. Im Falle der letzterwähnten Typen ist der Behandlungserfolg auch von der Massivität der Infektion unabhängig. Hier wollen wir noch einige diesbezügliche Beobachtungen Schmiths^{12a} zusammenfassen: Von den Mäusen, die mit 100 d. l. m. des *Pneumococcus* Typ 1 infiziert und mit 3×40 mg Sulfapyridin behandelt werden, bleiben 30–60% am

Tabelle 7.

Vergleichende Titrierung des Sulfanilamid, Sulfathiazol bei mit *Pneumococcus* Typ 3 intraperitoneal infizierten Mäusen.

(Summierung der am 17. 3. 1939 und 27. 6. 1939 ausgeführten Versuche.)

Die Infektion (ccm Bouillon- kultur)	Die Behandlung	Zahl der Tiere	am Leben geblieben		Durchschnittl. Lebensdauer der verendeten Tiere	Lebensdauer max. 14 "
			Zahl	%		
$0,5 \times 10^{-9}$	(Kontrolle)	7	1	14	1,4	
$0,5 \times 10^{-8}$	"	6	0	0	1,4	1,4
$0,5 \times 10^{-7}$	"	6	0	0	1,2	1,2
$0,5 \times 10^{-6}$	"	8	0	0	1,5	1,5
$0,5 \times 10^{-4}$	"	16	0	0	1,2	1,2
$0,5 \times 10^{-4}$	S. amid 6×10 mg	15	0	0	4,1	4,1
"	" 6×20 mg	15	0	0	5,6	5,6
"	S. thiazol 6×10 mg	19	0	0	4,6	4,6
"	" 6×20 mg	18	0	0	5,3	5,3
"	" 6×30 mg	19	1	6	7,7	8,4

Leben, nach 10.000 tödlichen Dosen hingegen nur 10—30% Bei energischerer Behandlung war dieser Unterschied noch auffallender. Dagegen konnte sie die mit Typ 3 infizierten Mäuse weder durch Aenderung der Infektionsmasse noch durch abwechselnde Dosierung am Leben erhalten. Die Versuche mit Typ 7 ergaben in dieser Hinsicht wieder auffallende Unterschiede. Bei einem Versuch injizierten *Cavalli* und *Magni*⁵² den mit 10^{-2} — 10^{-9} ccm *Pneumococcus* Typ 1 infizierten Mäusen 0,6 mg Sulfapyridin subkutan. Die Lebensdauer der mit verschiedenen Mengen infizierten Tiere wies einen regelmässigen Zusammenhang mit der Menge der einverleibten Keime auf, so dass der Zusammenhang zwischen dem harmonischen Durchschnitt der Lebensdauer und dem Logarithmus der injizierten Kokkenzahl in Form einer linearen Funktion ausgedrückt werden konnte.

4. Neue Gesichtspunkte bei der Wertbestimmung der Chemotherapeutica.

Zur Zeit der Entdeckung der Sulfanilamidderivate hatte es den Anschein, als ob die vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen keine besondere Aufgabe bedeute. Bald kam es aber in dieser Hinsicht infolge sorgfältig und mit grosser Umsicht ausgeführter Untersuchungen zu einer Enttäuschung. Man fand, dass die Entscheidung darüber, welches von zwei Mitteln das wirksamere sei, keine einfache Aufgabe darstellt, besonders wenn die Wirkungsunterschiede nicht wesentlich sind. Die Wirkung von zwei hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften stark abweichenden Mitteln wie Benzylsulfanilamid und Sulfanilamid lässt sich nach *Lockwood* und *Robinson*²²⁹ sehr schwer vergleichen. Das Benzylsulfanilamid (Proseptasin) wurde 1937 von *Whitby*²⁷⁷ als gleich-

wertig mit dem Sulfanilamid befunden; die Beweise dieser Behauptung standen im Jahre 1940 noch immer aus. *Lockwood* und *Robinson* fanden, entsprechend den Versuchsbedingungen, einmal das eine, ein andermal das andere Mittel für wirksamer; schliesslich haben sie festgestellt, dass der Wertbestimmung nie ein einziger Versuchstyp, sondern die Ergebnisse, die unter einer ständigen Abänderung der Versuchsbedingungen gewonnen werden, zugrunde gelegt werden sollen.

Buttle,⁴⁴ ferner *Fourneau*¹⁰⁷ und seine Mitarbeiter, haben 1937 gleichzeitig festgestellt, dass das von *Fromm* und *Wittmann*¹¹⁴ noch im Jahre 1908 hergestellte 4,4'-Diaminodiphenylsulfon wertvolle chemotherapeutische Eigenschaften besitzt. Seitdem gelangten sämtliche Prüfer zu dem Ergebnis, dass dieser Stoff erheblich energischer wirkt als das Sulfanilamid, in bezug auf seinen relativen Wert aber wurden sehr abweichende Meinungen geäussert. Es wurde von *Fourneau*¹⁰⁶ und seinen Genossen für zwanzigmal, von *Buttle*⁴⁰ und seinen Mitarbeitern hundertmal, von *Bauer* und *Rosenthal*¹³ dreissigmal, von *Raiziss*³⁰³ und seinen Genossen zehnmal wirksamer als das Sulfanilamid befunden. Auch das Sulfapyridin hat in dieser Beziehung zu Meinungsverschiedenheiten Anlass gegeben. Nach *Whitby*³⁷⁸ seien 2 mg des Präparates bei Pneumococcusinfektion der Mäuse ebenso wirksam wie 10 mg Sulfanilamid. Andere fanden, dass das Mittel kaum, wieder andere, dass es viel wirksamer sei als das Sulfanilamid. Wir verweisen in dieser Beziehung noch auf einen unserer besprochenen Versuche, wo das Mittel auf die Pneumokokken Typ 2 dreimal energischer wirkte als das Sulfanilamid.

Die auffallenden Meinungsunterschiede in bezug auf den chemotherapeutischen Wert der Verbindungen werden von *Marshall*, *Litchfield* und *White*²⁶² durch zwei Umstände erklärt: 1. Identische Dosen der einzelnen Mittel haben verschiedene Blutkonzentrationen zur Folge. 2. Weder die perorale noch die subkutane Verabreichung vermag eine gleichmässige Konzentration zu sichern. — Wir möchten dem noch hinzufügen, dass den verschiedenen Ergebnissen zum Teil auch die unterschiedliche Auswertung der Versuche zugrunde gelegt werden muss.

Die unter 1. erwähnte ist eine Eigenschaft des Präparates. Die unter 2. angeführte Schwierigkeit hängt mit der Dosierung zusammen und lässt sich durch entsprechende Technik sicher ausschalten. *Schmidt*³²³ versuchte, die gleichmässige Blutkonzentration durch häufige Verabreichung zu erzielen. Diese Methode dürfte sich kaum bewähren, da nach *Marshall* und *Cutting*²⁶¹ zu diesem Zweck mindestens eine 4stündliche perorale Verabreichung notwendig wäre. Eine so häufige Fütterung ist aber technisch schwierig und auch für die Tiere nicht indifferent.

Diese Tatsachen haben die Forscher veranlasst das Chemotherapeuticum mit dem Trinkwasser (*Seastone*³³⁵) oder — wie es ausführlich besprochen werden soll — mit der Nahrung der Tiere zu vermengen. *Bieter*, *Larson*, *Levine* und *Cranston*,²⁰ ferner unabhängig von ihnen *Litchfield*, *White* und *Marshall*²²² waren die ersten, die über Versuche dieser Art berichteten. Das Verfahren wurde von den zweiterwähnten Forschern ausgearbeitet. Die Darreichung des Chemotherapeuticums in der Nahrung wurde zu vergleichenden Zwecken bis heute auch von anderen Verfassern (*McKee*²⁴⁷ und

seine Mitarbeiter, *Cooper*⁶¹ und seine Mitarbeiter, *Bliss* und *Ott*,²⁸ *Frisk*,¹¹³ ferner *Klinefelter*,¹⁹³ *Buttle* und *Stephenson*¹³ durchgeführt.

Bieter,²⁰ *Marshall*,²²² *McKee*²⁴⁷ und ihre Mitarbeiter fügten den im Handel erhältlichen Tierfutter (Purina Dog Chow) das fein pulverisierte Chemoterapeuticum in 0,5–2% Menge hinzu. Die Tiere werden in Einzelkäfigen gehalten, die verbrauchte Nahrung gemessen und hieraus auf die Arzneimenge geschlossen. Die Tiere essen im Verlaufe des Tages nicht gleichmässig, dementsprechend schwankt auch die Arzneikonzentration des Blutes, diese Schwankung aber ist nicht sehr gross. *Marshall*²⁶² und seine Mitarbeiter haben folgende Minimal- und Maximalwerte bei Sulfanilamidreichung beobachtet: Bei 1%-iger Diät 14,4–20 bei 0,5%-iger 5,7–8,5, bei 0,25%-iger 2,4–3,7, bei einem anderen Versuch 1,9–3,9. Die aus diesen Extremwerten berechneten Durchschnitte verhalten sich wie die der verzehrten Nahrungsmengen, und die Berechnung ist auf dieser Grundlage mit Hilfe eines empirisch ermittelten Faktors leicht durchzuführen. Die Faktoren, die bei Multiplizierung mit der verbrauchten Arzneimenge die Blutkonzentration ergeben, sind folgende: für Sulfanilamid 0,39, für Sulfapyridin 0,49, für Sulfathiazol 0,33, für 4,4'-Diaminodiphenylsulfon 0,77, für Sulfaguanidin 0,14. Für das Sulfon ist der Faktor grösser, wenn die Nahrung von dem Arzneimittel ganz kleine Mengen enthält. So ergibt sich bei einer 0,1%igen Kost ein Faktorwert von 1,03. Der Zusammenhang war also bei diesem Präparat am wenigsten regelmässig.

Wird das Chemotherapeuticum mit der Kost gemischt, so ist der Gehalt des Blutes an dem betreffenden Präparat in Abhängigkeit von der Art des Sulfanilamidderivates sehr verschieden. *Frisk*¹¹³ fand im Blute der Tiere, die mit einer 0,56% Arzneimittel enthaltenden Kost 1 Tag oder länger gefüttert wurden, folgende Werte für die Arzneimittelkonzentration im Blute: für Sulfapyridin 7,97 mg %, für Sulfathiazol 5,41 mg %, für Sulfapyrimidin 32,2 mg %, für N¹-Dimethylacryloylsulfanilamid 20,72 mg %, für Sulfathiophen 0,89 mg %. Diese Werte stellen Durchschnitte von 5tägigen Versuchen dar. *Frisk* bestimmte die Blutkonzentration immer zum selben Zeitpunkt (9 Uhr in der Früh). Die Durchschnitte der einzelnen Tage weichen selbstverständlich voneinander etwas ab. Die Extremwerte waren bei Sulfapyridin $6,3 \pm 1,0$ und $9,76 \pm 0,91$ mg %.

Einige Forscher infizierten die Tiere erst 24–48 Stunden nach der Einleitung der Arzneifütterung und behandelten sie weiter noch 3,²⁶² 5,¹¹³ 7²⁸ oder 10²⁰ 247 Tage lang. Wurde die Infektion sofort zu Beginn der Behandlung vorgenommen, so waren die Erfolge weniger günstig. Selbstverständlich hatte die Verkürzung der Behandlungsdauer auch die Verschlimmerung der Resultate zur Folge.²²²

*Bieter*²⁰ und seine Mitarbeiter infizierten Mäuse subkutan mit 4.000–8.000 D. L. 50 Pneumokokken Typ 2 und fütterten sie mit einer 1 bzw. 0,5% enthaltenden Sulfapyridinkost. Auf diese Weise konnten 63,4 bzw. 44% der Tiere gerettet werden. Zur Vergleichung der Wirkung des Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol und Sulfapyridin verabreichten *Bliss* und *Ott*²⁸ den mit Staphylokokken infizierten Mäusen eine 1%-ige Diät. Bei diesen Versuchen waren beide Thiazolderivate gleichweise wirksamer als das Sulfapyridin. *McKee*²⁴⁷ und seine Mitarbeiter fanden das Sulfapyridin und das Sulfathiazol gegen zu 9

verschiedenen Typen gehörenden Pneumokokken und je 1 Strepto- bzw. Meningokokkenstamm für gleich wirksam. *Frisk*¹¹³ verglich die Wirkung von 12 verschiedenen Verbindungen bei Infektion der Maus mit *Pneumococcus* Typ 1. Als Futter diente eine Nahrung, die von den Mitteln 0,28 bzw. 0,56% enthielt. Entsprechend den zwei verschiedenen Konzentrationen konnten mit Sulfathiazol 85,7 bzw. 48,7%, mit Sulfapyridin 81,8 bzw. 55,2% der Tiere gerettet werden. Aus den Protokollen geht hervor, dass eine Nahrung, die eine niedrigere Arzneikonzentration enthielt, welches Mittel auch verwendet wurde, verhältnismässig immer mehr Tiere rettete als die konzentrierte. Entgegen der Behauptung *Frisks* kann somit festgestellt werden, dass die Verdoppelung der Arzneidosis die Wirkung nicht verdoppelt.

Da der Zusammenhang zwischen der verbrauchten Arzneimenge und dem gewährten Schutz nicht linear ist, ferner, da identische Arzneimengen selbst bei Vermischung mit dem Tierfutter verschiedene Blutspiegelwerte liefern, waren *Marshall*²⁶² und seine Mitarbeiter gezwungen, bei der Auswertung der Ergebnisse auch auf diese Umstände Rücksicht zu nehmen. Zu diesem Zweck bestimmten sie auf Grund der mit verschiedenen Arzneimengen angestellten Versuche mit Hilfe der Interpolation jene Menge des Mittels, die genau die Hälfte der Tiere gerade noch rettet. Aus dieser Menge (S. D. 50 = Median Survival Dosis) lassen sich die entsprechenden Blutkonzentrationen mit Hilfe der schon erwähnten Faktoren berechnen (S. B. C. 50 = Median Survival Blood Concentration); diese Ergebnisse wurden der Vergleichung der Mittel zugrunde gelegt. Z. B. wurde in einem ihrer Streptokokkenversuche S. B. C. 50 für Sulfanilamid 0,73, für 4,4'-Diaminodiphenylsulfon 0,27 gefunden. Das Verhältnis dieser Zahlen $0,73:0,27 = 2,69$ bedeutet, dass das Sulfon 2,69-mal wirksamer als das Sulfanilamid sei. Die mit der selben Methodik gefundenen wichtigeren Daten sind folgende: Im Falle einer Streptococcusinfektion (200 d.l.m.) verhalten sich die Wirkung des Sulfanilamid, Sulfapyridin und Sulfon wie 1:1,08:2,69. Sulfaguanidin²⁶¹ ist gegen Streptokokken nur halb so wirksam wie das Sulfanilamid, gegen *Pneumococcus* Typ 1 wirken sie ungefähr gleich stark. Auf Grund ihrer²²³ Ergebnisse verhalten sich das Sulfapyridin, Sulfanilamid, Sulfathiazol und Sulfon — gegen *Pneumococcus* Typ 1 — wie 1:0,43:1,2:5, 4—7,9.

Die Wertbestimmungsmethode von *Bieter*, *Marshall* und ihren Mitarbeitern, der die Darreichung der Präparate in der Nahrung zugrunde liegt, scheint auch uns die verlässlichste zu sein. Wir versuchten darum, die Methode auch in unserem Institut einzuführen. Zweifelsohne haftet dem Verfahren der Nachteil an, dass die individuelle Unterbringung der Tiere und die ständige Wägung der verbrauchten Futtermenge eine ansehnliche Mehrarbeit bedeutet abgesehen davon, dass das von den amerikanischen Verfassern verwendete Tierfutter heute nicht beschaffen werden kann. Darum versuchten wir zwecks Beseitigung der erwähnten Schwierigkeiten die Methode zu modifizieren. Obwohl wegen der Knappheit der Tierbestände bei den Versuchen nur eine mässige Anzahl von Tieren verwendet werden konnte und unser Ziel über die Fragen der Dosierung nicht hinausgehen kann, wollen wir unsere mit *Diczfalusy*¹⁶⁸ ausgeführten Versuche doch mitteilen, da die gewonnenen Erfahrungen für spätere Forschungen evtl. dienlich sein könnten.

Der Zweck dieser Versuche war die Ermittlung einer Modifikation, die gestattet, die individuelle Nahrungsverzehrung der einzelnen Tiere ausser acht lassend, allein aus dem Sulfanilamidgehalt der Kost auf den Blutarzneispiegel zu schliessen. Mit anderen Worten: *Gesucht wurde die Korrelation zwischen dem Sulfanilamidgehalt der Nahrung und des Blutes, ohne Rücksicht auf die von den einzelnen Tieren verbrauchte Futtermenge.*

Wie erwähnt, kam nur ein Tierfutter in Betracht, das auch heute beschaffen werden kann. Darum wurde zunächst die Nahrungsmischung ausprobiert, die bei der Mäusezüchtung verwendet wird. (Die Zusammensetzung s. auf Seite 19). Der einzige Unterschied bestand darin, dass in den Versuchen anstelle des Maisgrieses Gerstengries verwendet wurde.

Das in unserem Institut verwendete Mäusefutter enthält ziemlich viel Wasser. So erübrigt sich, den Tieren auch Trinkwasser zu geben. Da die Bestandteile der Nahrung grob gemahlen sind, wurden die Präparate, um ihre gleichmässige Verteilung zu sichern, dem Futter in gelöstem Zustand hinzugefügt. Vom Sulfanilamid und Sulfamethylthiazol wurde die abgewogene Menge in der äquivalenten Menge von karbonatfreier Natronlauge gelöst, dann dem Bedarf entsprechende 0,2–5%-ige Lösung hergestellt, 1 Teil der Lösung mit 9 Teilen der breiigen Nahrung in einer Reibschale sorgfältig vermengt. Mithin wurde die Arzneilösung mit der Nahrung aufs zehnfache verdünnt. Im Falle des 4,4'-Diaminodiphenylsulfon wurde das verhältnismässig gut lösliche Dihydrochlorid verwendet.

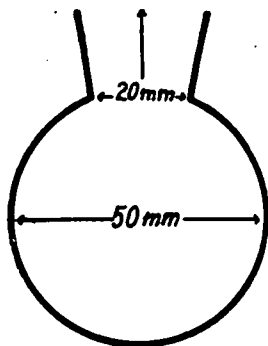


Abb. 3.

Form und Ausmass
des Fütterungsgefässes.

Vor allem war die Frage zu beantworten, welche Futtermenge von den 18–22 g schweren Tieren verzehrt wird. Die näheren Zusammenhänge zwischen Körpergewicht und Nahrungsmittelverbrauch wurden nicht untersucht, da es technisch ohnehin unmöglich ist, in einem Versuch das individuelle Gewicht der zahlreichen Tiere innerhalb der angegebenen Grenzen zu berücksichtigen.

Die Messung der verzehrten Nahrungsmenge ist mit nicht unerheblichen Schwierigkeiten verbunden, da die Nahrung von den Tieren gewohnheitsgemäss zerwühlt und verstreut wird. Darum wurde nach längeren Versuchen der Glasfütterungsverschlagentyp verwendet, dessen Form und Ausmass aus Abb. 3 ersichtlich sind. Wird das Gefäss in lotrechter Lage auf eine Petrischale von 9 cm Durchmesser gestellt, so kann das auf den Rand des Gefässes kletternde Tier nur wenig Nahrung aus dem Gefäss verstreuen, auch die verstreute Menge fällt auf den Deckel der Petrischale und kann abgewogen werden. Wir trachteten aus dem täglich mit frischer Nahrung versorgten Fütterungsgefäss die verzehrte Nahrung mit einer ctg-Genauigkeit zu bestimmen.

Der Nahrungsverbrauch der Mäuse wurde in Tab. 8. aufgestellt.

Wie ersichtlich, ist der Nahrungsverbrauch selbst in der selben Gewichtsgruppe ziemlich schwankend. Aus der Rubrik „Extremwerte“ geht hervor, dass auch der tägliche Verbrauch desselben Tieres während der 4–7-tägigen Versuchsperiode beträchtlich wechselnd ist. Die kleinste verbrauchte Menge war 8 g, die grösste 23 g. Auf Grund der mit 14 Tieren ausgeführten 80 Bestimmungen erhielten wir einen Durchschnitt von $14,15 \pm 0,38$ g. Die Werte weisen eine Streuung

Tabelle 8.

Täglicher Nahrungsverbrauch der Mäuse in Grammen.

Bezeichnung des Tieres	Versuchs- dauer in Tagen	Gefundene Extremwerte		Durchschnitt sam Mittel- fehler	Streuung der einzelnen Werte
		maximum	minimum		
1	4	14,42	14,08	14,27 \pm 0,08	\pm 0,15
2	4	15,52	10,11	11,75 \pm 1,28	\pm 2,57
3	4	11,11	8,00	9,47 \pm 0,09	\pm 0,18
4	4	16,31	11,41	13,69 \pm 1,01	\pm 2,02
5	4	13,48	10,85	11,96 \pm 0,03	\pm 0,06
6	4	13,30	11,79	12,96 \pm 0,10	\pm 0,02
7	7	16,86	10,20	13,92 \pm 0,93	\pm 2,45
8	7	15,60	9,65	11,60 \pm 0,72	\pm 1,91
9	7	21,90	10,30	14,91 \pm 1,41	\pm 3,73
10	7	19,25	13,00	16,21 \pm 0,83	\pm 2,19
11	7	19,90	11,60	16,48 \pm 1,06	\pm 2,81
12	7	18,95	10,30	15,54 \pm 1,18	\pm 3,13
13	7	23,00	9,80	17,75 \pm 1,76	\pm 4,66
14	7	18,10	8,98	13,39 \pm 1,23	\pm 3,25

von $\pm 3,41$ g auf. Dies bedeutet, dass zwei Drittel der Werte zwischen den Grenzwerten 10,74 und 17,56 liegen. Diese beträchtliche Streuung ist zum Teil durch die individuellen Unterschiede, zum Teil durch die wechselnde Fresslust desselben Tieres bedingt.

Schon diese wesentlichen Schwankungen in der Nahrungsaufnahme machen es notwendig, anstatt der individuellen Werte den in den einzelnen Gruppen beobachteten Durchschnitt zu berücksichtigen. Dies um so mehr, als die Wertbestimmung der Sulfanilamidpräparate in einer befriedigenden Weise nur unter der Heranziehung einer grösseren Anzahl von Tieren erfolgen kann. Es erübrigt sich dann, den Blutarzneispiegel für jedes Tier auf Grund seines individuellen Nahrungsverbrauches zu errechnen. Ausgehend von diesen Erwägungen wird bei uns — abweichend von der Methodik der amerikanischen Verfasser — der Nahrungsverbrauch bzw. die hiermit verbundene Arzneimiteleinfuhr nicht beachtet, sondern nur der direkte Zusammenhang zwischen dem Arzneigehalt der Nahrung und dem Blutspiegel gesucht. Hierdurch ist aber die individuelle Unterbringung der Tiere und die Messung des Nahrungsverbrauches überflüssig geworden.

In bezug auf den Zusammenhang zwischen Arzneigehalt der Nahrung und Blutarzneispiegel geben Tabelle 9. und 10. Aufschluss.

Zur Vereinfachung und um einen Durchschnitt zu gewinnen wurde die Sulfanilamidkonzentration an Gruppen von je 5 Tieren mit 18—22 g Gewicht studiert. Die Tiergruppen wurden mit einer das entsprechende Sulfanilamid enthaltenden Kost ernährt und die Konzentration der Mittel im Blute der Tiere nach 24—48 Stunden serienweise bestimmt, und zwar in der Weise, dass das Blut der fünf Tiere derselben Gruppe zu einem gegebenen Zeitpunkt vermengt wurde. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens liegt in dem Umstand, dass aus der Schwanzvene der einzelnen Tiere nur je 0,02 ccm Blut zu entnehmen ist, was für die Tiere keinerlei Schädigung bedeutet; nach Vermengung der fünf Blutproben

erhält man 0,1 ccm, das zur genauen Bestimmung der Sulfanilamide selbst in Falle einer sehr niedrigen Konzentration ausreicht. In dieser Weise konnte die Untersuchung im Laufe der zweitägigen Versuchsperiode bei denselben Tieren wiederholt und doch ohne Schädigung der Tiere durchgeführt werden. Die Blutentnahme erfolgte frühestens 24 Stunden nach Einleitung der Fütterung früh um 9, nachmittags um 3 und abends um 9 Uhr. Die im Laufe des Tages vorgenommenen Untersuchungen lieferten schwankende Ergebnisse. In Übereinstimmung mit anderen Verfassern wurden im allgemeinen niedrigere Früh- und höhere Abendwerte gefunden. Der Durchschnitt wurde aus dem Frühminimum und dem Abendmaximum berechnet.

Zur Bestimmung der Sulfanilamidkonzentration verwendeten wir die Methode von *Druey* und *Oesterheld*³² in der Modifikation von *Diczfalusy* und *Sonkoly*.⁷² Das Originalverfahren erfordert 1 ccm Blut und lässt das Ergebnis von einem Kolorimeter ablesen. Die Modifikation arbeitet mit 0,1 ccm. Um eine genaue Ablesung zu gewähren, wird ein Stufenphotometer verwendet. Die Mikromethode von *Diczfalusy* und *Sonkoly* wird wie folgt ausgeführt:

Die erforderlichen Lösungen sind mit denen des Originalverfahrens identisch: 10%-ige Trichloressigsäure, 0,1%-ige frisch zubereitete Natriumnitritlösung 0,5%-ige Sulfaminsäure und 0,1%-iges Dinatriumsalz der 1-Sulfamethylaminonaphthalin-8-sulfosäure.

Um die Blutentnahme zu erleichtern, werden die Tiere zunächst 30–50 Minuten in einem Brutschrank gehalten. Das Tier wird senkrecht mit dem Schwanz nach unten gehalten, das Schwanzende abgekniffen und 0,02 ccm Blut mit einer Sahlischen Hämoglobinpipette in 2,4 ccm dest. Wasser eingeführt. Nach der Entnahme von je 0,02 ccm Blut von jedem Tier der Fünfergruppe beträgt die im Reagenzglas befindliche Flüssigkeitsmenge 2,5 ccm. Nach einigen Minuten wird das Reagenzglas in heisses Wasser getaucht, sein Inhalt nach 2 Min. mit 1 ccm 10%-iger Trichloressigsäure versetzt und sofort filtriert. Aus dem Filtrat werden 2,5 ccm abpipettiert und in einem anderen Reagenzglas in schmelzendes Eis gestellt, nach Abkühlung mit 0,5 ccm Nitritlösung und 3 Min. später mit 0,5 ccm Sulfaminsäure versetzt, schliesslich wiederholt umgeschüttelt und nach 1 Min. mit 1 ccm Reagens versetzt. Nach 10 Min. stehen wird die Extinktion in einer 10 mm hohen Küvette mit dem Filter S 50 mit Hilfe des Stufenphotometers bestimmt. Die aufgenommene Kurve zeigt einen linearen Verlauf und eignet sich sowohl für das Sulfanilamid als auch für das Sulfamethylthiazol unter Beachtung der äquivalenten Gewichte. Das 4,4'-Diaminodiphenylsulfon liefert eine mehr bläuliche Farbe; weshalb zur Bestimmung dieses Mittels eine besondere Kurve aufgenommen werden muss. Selbst bei Konzentrationen von 0,2–0,3 mg % erhält man noch gut ablesbare Werte.

Das Verfahren erwies sich als sehr genau und verlässlich. Das ursprüngliche Makroverfahren liefert etwas niedrigere, die Mikromethode etwas höhere Werte als die theoretisch errechneten. Zur Veranschaulichung der Zuverlässigkeit der Methode seien folgende Resultate angeführt: Menschlichem Zitratblut wurde 4 mg % Sulfanilamid hinzugefügt; 6 Bestimmungen ergaben einen Durchschnitt von 4,04 mg %. Anstelle von 4 mg % Sulfamethylthiazol erhielten wir 4,13 mg %, anstatt 4 mg % Sulfon 4,11 mg %, anstatt 10 mg % aber 9,9 mg %.

Tabelle 9.

Schwankung des Blutsulfamethylthiazolspiegels bei einer verschiedenen Menge des Präparates enthaltender Kost.
(48 stündige Beobachtungszeit.)

Konzentration des Präparates in der Nahrung	Konzentration des Präparates im Blut (mg ‰)				
	9 ^h v. M.	8 ^h n. M.	9 ^h v. M.	3 ^h n. M.	9 ^h n. M.
5 ‰	15,3	23,0	16,8	16,2	19,7
2 ‰	10,3	14,6	12,0	9,4	13,4
1 ‰	6,4	9,1	6,2	6,4	8,4
0,5 ‰	5,4	8,8	3,8	4,8	4,4

Aus einem der in Tab. 9. angeführten Versuche ersieht man, dass der Blutarzneispiegel der mit Sulfamethylthiazol gefütterten Tiere ausgeprägte Tagesschwankungen zeigt, wie es auch von anderen Verfassern beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der an Gruppen von je 5 Tieren ausgeführten Bestimmungen wurden in Tabelle 10. zusammengestellt.

Tabelle 10.

Beziehungen zwischen dem Arzneigehalt der Nahrung und des Blutes.

Chemotherapeuticum und seine Konzentration in der Nahrung		Konzentration in Blut bei den einzelnen Versuchen	Durchschnitt der Versuche
Sulfanilamid	5 ‰	18,0 mg ‰	17,95 mg ‰
"	" "	17,9 " "	
"	2 "	5,8 " "	6,25 mg ‰
"	" "	6,7 " "	
"	1 "	4,5 " "	4,15 mg ‰
"	" "	3,8 " "	
"	0,5 "	2,3 " "	2,05 mg ‰
"	" "	1,8 " "	
"	0,2 "	0,6 " "	0,60 mg ‰
Sulfamethylthiazol	5 "	17,8 " "	18,80 mg ‰
"	" "	18,7 " "	
"	" "	19,9 " "	
"	2 "	11,8 " "	11,80 mg ‰
"	" "	12,5 " "	
"	" "	11,1 " "	
"	1 "	9,2 " "	7,83 mg ‰
"	" "	7,5 " "	
"	" "	6,8 " "	
"	0,5 "	7,3 " "	5,53 mg ‰
"	" "	5,6 " "	
"	" "	3,7 " "	
"	0,2 "	1,5 " "	1,50 mg ‰
4,4' - Diaminodi-phenylsulfon	0,5 "	6,6 " "	7,35 mg ‰
"	" "	8,1 " "	
"	0,125 "	3,3 " "	2,96 mg ‰
"	" "	2,6 " "	
"	0,025 "	2,3 " "	2,30 mg ‰

Hieraus folgt, dass die zu verschiedenen Zeitpunkten an verschiedenen Tiergruppen gewonnenen Werte von Blutarzneispiegel sich wie die Arzneikonzentration der Nahrung verhalten. Die

beobachteten Blutwerte sind erheblich höher als die von anderen Verfassern bei der Anwendung einer Kost der nämlichen Arzneikonzentration gefundenen. Wir glauben diese Tatsache durch den Umstand erklären zu können, dass die Mäuse von der von uns gebotenen Nahrung wegen ihres grösseren Wassergehaltes um ein vielfaches mehr verzehren als von den trockenen Nahrungen anderer Forscher. Die aus dem Durchschnitt der einzelnen Versuche erhaltenen Kurven zeigen den Zusammenhang zwischen Arzneigehalt der Nahrung und des Blutes.

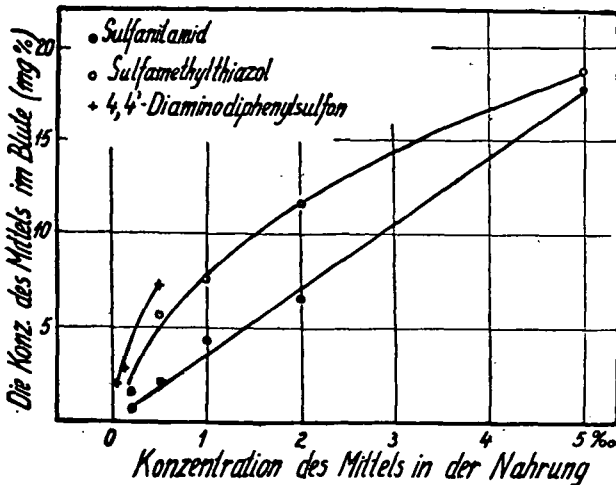


Abb 4.

Zusammenhang zwischen Arzneigehalt der Nahrung und des Blutes.

Aus der Kurve ersieht man das lineare Verhältnis zwischen der Sulfanilamidkonzentration von Nahrung und Blut. Die Sulfamethylthiazolkurve entspricht einer Parabel, d. h. das Präparat wird im Falle einer niedrigeren Konzentration besser resorbiert als bei Verwendung einer mehr Arznei enthaltenden Kost. Die Ursache dieser Erscheinung konnten wir bisher nicht feststellen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Nahrung, die das Arzneimittel in einer grösseren Konzentration enthält, von den Tieren weniger gierig genommen wird. In bezug auf die Sulfonresorption konnte nur ein kurzer Abschnitt der Kurve gezeichnet werden, da die Unruhe der Tiere schon bei der 0,05% enthaltenden Diät auf die Toxizität des Mittels hinweis, weshalb die Anwendung einer noch höheren Konzentration nicht in Frage kam. Seltsamerweise findet man im Blut der Tiere, deren Nahrung verhältnismässig sehr geringe Sulfonmengen enthält, ziemlich hohe Werte, wofür auch der Kurvenverlauf spricht, so fanden wir bei einer 0,025 ‰igen Nahrungskonzentration 2,3 mg % im Blute (s. Tab. 10.). Wir glaubten, dass vielleicht die Mikromethode der sehr niedrigen Konzentrationen nicht entspreche und gaben darum drei Gruppen von je 5 Tieren diese Diät; dann töteten wir die Tiere mit Chloroform und bestimmten die Arzneikonzentration in je 1 ccm dem Herzen entnommenen Blut nach der *Druy-Oesterhelds*chen Originalmethode. Die gefundenen Konzentrationen waren 2,1, 1,8 und 2,3 mg % nach Verabreichung einer 0,025 ‰ Sulfon enthaltenden

Kost. Es steht also fest, dass sehr geringe Mengen des Sulfons verhältnismässig viel besser resorbiert werden als grössere Mengen. Diese Beobachtung stimmt mit denen von *Marshall* und seinen Mitarbeitern gut überein.

Die Ergebnisse zusammenfassend, lässt sich folgendes feststellen: 1. *Die Resorption des mit der Nahrung gemischten Sulfanilamid hängt hochgradig von der Zusammensetzung der Nahrung ab*, wahrscheinlich deshalb, weil der Tagesbedarf entsprechend den einzelnen Nahrungsmitteln veränderlich ist. 2. *Die Sulfanilamidkonzentration des Blutes hängt mit dem Sulfanilamidgehalt der Nahrung zusammen, so dass aus dem Wert des letzteren die erste errechnet werden kann.* 3. *Der Zusammenhang ist, abhängig von dem Präparat, von verschiedenem Typ und ist nicht immer linear.* 4. *Unser Verfahren bedeutet gegenüber dem der amerikanischen Verfasser technische Vorteile, da die individuelle Unterbringung der Tiere und die Messung der verzehrten Nahrung sich erübrigen.*

III. Kapitel.



In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate.

1. Die die In-vitro-Wirkung beeinflussenden Versuchsfaktoren.

Es ist kein Zufall, dass die unmittelbar auf die Krankheitserreger ausgeübte Wirkung der Sulfanilamidderivate gerade Londoner Bakteriologen nachweisen konnten. Die antibiotische Wirkung der Sulfanilamidderivate kann nämlich mit der groben Wirkung der gewöhnlichen Desinfizienzien, die sich schon bei den einfachsten Versuchsbedingungen merkbar macht, nicht verglichen werden. Zum Nachweis dieser Wirkung bedarf es solch feiner Methoden, die damals nur den Schülern von *A. E. Wright* zur Verfügung standen.

Die Entdeckung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung wollen wir nicht noch einmal erörtern, nur so viel sei erwähnt, dass die 1937 veröffentlichten Ergebnisse von *Colebrook*, *Buttle* und *O'Meara*⁵⁷ noch im selben Jahr oder Anfang des nächsten Jahres von zahlreichen Forschern (*Nitti*, *Bovet* und *Depierre*,²⁸⁷ *Long* und *Bliss*,²³² *Hoare*,¹⁵⁰ *Finklestone-Sayliss*, *Paine* und *Patrick*,⁹⁵ *Gay* und *Clark*,¹²² *Buttle*⁴² und seinen Mitarbeitern) bestätigt wurden. Sie haben ausnahmslos festgestellt, dass das dem Blut oder der Fleischbrühe im Verhältnis 1:1000—1:10.000 hinzugefügte Sulfanilamid das Gedeihen von einigen abgeimpften Kokken verhindert oder die Kokken gerade tötet. *Helmholtz*¹⁴⁴ berichtete noch im Jahre 1937 über die starke bakteriostatische Wirkung des Urins von Personen, die mit Sulfanilamid behandelt wurden.

Es scheint weniger interessant, die Ergebnisse dieser übereinstimmenden Versuche zu besprechen, als die diesen widersprechenden Beobachtungen. *Bürgers*⁴⁵ schreibt über die Versuche *Colebrooks* und seiner Mitarbeiter (1937) wie folgt: „Neuere Versuche von *Domagk* und mir können allerdings diese Tatsache nicht bestätigen.“ Die Ein-